

**GERAÇÃO DE HÍBRIDOS DE
Pisolithus microcarpus (Cooke & Masee) G. Cunn.
E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO DE
Eucalyptus "urograndis" E ATIVIDADE
CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

MARIA FLORIANA ESTEVES DE ABREU

2002

54225

MEV046410

MARIA FLORIANA ESTEVES DE ABREU

**GERAÇÃO DE HÍBRIDOS DE *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee)
G. Cunn. E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO DE
Eucalyptus “urograndis” E ATIVIDADE CONTRA FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
em Fitopatologia, para obtenção do título de
“Doutor”.

Orientador

Prof. Sebastião Carlos da Silva Rosado



LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2002

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Abreu, Maria Floriana Esteves de

Geração de híbridos de *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn. e seus efeitos no crescimento de *Eucalyptus* "urograndis" e atividade contra fungos fitopatogênicos / Maria Floriana Esteves de Abreu. -- Lavras : UFLA, 2002.

92 p. : il.

Orientador: Sebastião Carlos da Silva Rosado.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia

1. Eucalipto. 2. Ectomicorriza. 3. Crescimento. 4. Híbrido. 5. CGC. 6. CEC. 7. Extrato. 8. Patógeno. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.97342

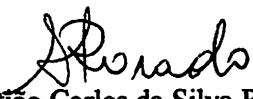
MARIA FLORIANA ESTEVES DE ABREU

**GERAÇÃO DE HÍBRIDOS
DE *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn. E SEUS EFEITOS
NO CRESCIMENTO DE
Eucalyptus “urograndis” E ATIVIDADE CONTRA FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 16 de agosto de 2002

Profa. Dulcinéia de Carvalho.	UFLA
Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Profa. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Prof. Vetúria Lopes de Oliveira	UFSC


Prof. Sebastião Carlos da Silva Rosado
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

A Deus, pela força no desenvolvimento deste trabalho, e
ao meu orientador,
Professor Rosado, pela paciência, entusiasmo
e orientação.

Aos meus Pais, João e Emília, sem eles, com certeza, não
chegaria até aqui.
A minha irmã Marleni,

Ofereço

À minha filha Vivian e ao meu marido Mario,
pela compreensão, paciência e amor

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo acalento e força em todos os momentos.

Ao meu marido Mario, pela presença constante em minha vida.

À minha filha Vivian, pela sua existência.

Aos meus Pais pelo exemplo de vida, amor e carinho silenciosos.

Aos meus irmãos, Jinho, Neide, Mauro, Márcio, Maciel, Marçal, Cristina e Marley, pelo amor e carinho.

Ao Marinho, Andrés e Carla, pelo agradável convívio.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e aos Departamentos de Fitopatologia e Ciências Florestais, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Ao professor Moacir Pascoal, pela disponibilidade de uso da casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia.

Ao professor Sebastião Carlos da Silva Rosado, pela orientação e ensinamentos.

Aos professores Vetúria, Maria das Graças, Dulcinéia e Mário Lúcio, pelas valiosas sugestões.

À professora Janice pela grande ajuda.

Ao prof. Denílson do Departamento de Química.

Aos colegas de curso.

Aos colegas e amigos do laboratório de Melhoramento Florestal, Anderson, Nilza, Ana Carolina, Anderson Neves, Maria Carolina, Sheila, Joema, Afrânio, Adélcio, Regiane e Marcinha.

À colega e amiga Gilvane, pela ajuda incondicional.

Aos funcionários do laboratório de Cultura de Tecidos, Wantuil e Claret, pela ajuda constante.

Ao Antônio, pelos trabalhos fotográficos.

À laboratorista e amiga Eloísa, pela grande ajuda no decorrer do curso.

À Karla, meu braço direito, nas avaliações finais.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Considerações gerais.....	4
2.2 Síntese de ectomicorrizas em eucalipto.....	7
2.3 Importância da fertilidade do solo na micorrização.....	9
2.4 Importância das ectomicorrizas na absorção de fósforo e nitrogênio.....	10
2.5 Ectomicorrizas no controle de patógenos radiculares.....	12
3 Referências Bibliográficas.....	19
CAPÍTULO 2 Geração e seleção de culturas híbridas de <i>Pisolithus microcarpus</i> para inoculação em <i>Eucalyptus</i> “urograndis”	27
Resumo.....	28
Abstract.....	29
1 Introdução.....	30
2 Material e Métodos.....	32
2.1 Obtenção do fungo ectomicorrízico.....	32
2.2. Preparo do substrato.....	35
2.3 Formação das mudas.....	35
2.4 Condução e avaliação do experimento.....	36
2.5 Eficiência micorrízica.....	38
3 Resultados e Discussão.....	39
3.1 Crescimento e produção de matéria seca.....	39
3.2 Percentagem e conteúdo de nitrogênio e fósforo.....	41
3.3 Eficiência micorrízica.....	44
3.4 Colonização micorrízica.....	46
4 Conclusões.....	57
5 Referências Bibliográficas.....	58
CAPÍTULO 3 Atividade antifúngica de culturas e extratos do fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> e inibição de crescimento de patógenos radiculares.....	62
Resumo.....	63

Abstract.....	64
1 Introdução.....	65
2 Material e Métodos.....	67
2.1 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de fungos ectomicorrízicos.....	67
2.1.1 Preparo do inóculo do fungo ectomicorrízico.....	67
2.1.2 Obtenção do extrato dos fungos ectomicorrízicos.....	67
2.1.3 Obtenção da cultura do fungo <i>Cladosporium herbarum</i>	68
2.1.4 Cromatografia em camada delgada.....	68
2.2 Efeito de extratos ectomicorrízicos na inibição do crescimento de <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Pythium</i> sp.....	68
2.2.1 Delineamento experimental.....	69
2.2.2 Avaliação e condução do experimento.....	69
2.3 Pareamento de 10 isolados dicarióticos de <i>Pisolithus microcarpus</i> com cultura de <i>R. solani</i>	70
2.4 Inibição do crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> por extratos de fungos ectomicorrízicos.....	70
2.4.1 Obtenção do fungo patogênico.....	70
2.4.2 Obtenção dos extratos dos fungos ectomicorrízicos.....	71
2.4.3 Condução do experimento.....	71
2.5 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de 3 isolados ectomicorrízicos, usando como padrão o ácido oxálico e ácido clorogênico.....	71
3 Resultados e Discussão.....	73
3.1 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de fungos ectomicorrízicos.....	73
3.2 Efeito de extratos ectomicorrízicos na inibição do crescimento de <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Pythium</i> sp.....	74
3.3 Pareamento de 10 isolados dicarióticos de <i>Pisolithus microcarpus</i> com cultura de <i>Rhizoctonia solani</i>	76
3.4 Inibição do crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> em extratos de fungos ectomicorrízicos.....	78
3.5 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de 3 isolados ectomicorrízicos, usando como padrão o ácido oxálico e ácido clorogênico.....	79
4 Conclusões.....	82
5 Referências Bibliográficas.....	83
ANEXOS.....	86

RESUMO GERAL

ABREU, Maria Floriana Esteves. Geração de híbridos de *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn. e seus efeitos no crescimento de *Eucalyptus* “urograndis” e atividade contra fungos fitopatogênicos. 2002. 92 p (tese - Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

Culturas monocarióticas, obtidas da germinação de esporos de basidiocarpos de *Pisolithus microcarpus*, coletados em povoamentos de *Eucalyptus sp.*, foram cruzadas, obtendo-se culturas dicarióticas. Avaliou-se o efeito dessas no crescimento de mudas de *Eucalyptus* “urograndis”, e na absorção de fósforo e nitrogênio. Essas culturas foram cultivadas em laboratório e, posteriormente, inoculou-se em mudas de eucalipto com 85 dias de idade. Aos 203 dias, as mudas foram avaliadas quanto à altura total, diâmetro do colo, peso seco da parte aérea e raízes, sendo que uma parte das raízes foi separada para determinação da porcentagem de micorrização. Avaliaram-se também a concentração e o conteúdo de fósforo e de nitrogênio nas folhas. Observaram-se efeitos positivos da inoculação e significativas diferenças entre os isolados. Observou-se a significância da Capacidade Geral de Cruzamento, enquanto que a Capacidade Específica de cruzamento não foi significativa. Esses resultados permitiram concluir que os efeitos genéticos entre os isolados são predominantemente aditivos, sugerindo a possibilidade de uso de esporos como agentes de inoculação. Num experimento adicional, detectou-se substâncias antifúngicas nos isolados dicarióticos estudados anteriormente, usando-se placas de sílica (CCD – Cromatografia em camada delgada). Quando os cromatogramas foram pulverizados com suspensão de esporos de *Cladosporium herbarum*, observaram-se efeitos inibitórios ao fungo em teste. Extratos dos fungos ectomicorrízicos foram testados a fim de verificar o efeito desses em inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum*, constatando-se o não antagonismo das substâncias. Quando se fez o pareamento de culturas dos isolados ectomicorrízicos de *Pisolithus microcarpus*, com cultura de *Rhizoctonia solani*, observou-se o efeito inibitório de todos os isolados. Extratos aquosos de três isolados dicarióticos (D4, D6 e D7), foram aplicados em placas de CCD.

*Comitê Orientador: Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA (Orientador); Prof^ª Dulcinéia de Carvalho – UFLA; Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA; Prof^ª Maria das Graças Cardoso – UFLA.

Aplicaram-se, também, ácido oxálico e ácido clorogênico, com o objetivo de verificar a presença desses compostos nos extratos ectomicorrízicos. Comparando-se o Rf (fator de retenção), concluiu-se que os extratos provavelmente não apresentam esses ácidos em sua composição. Observou-se também, pelo Rf, que os três isolados sintetizaram as mesmas substâncias. Todos os extratos testados foram tóxicos a *C. herbarum*. Pelos resultados, observou-se que metabólitos antifúngicos foram produzidos por todos os isolados e tiveram efeito tóxico em relação a *Rhizoctonia solani* e *Cladosporium herbarum*

GENERAL ABSTRACT

ABREU, Maria Floriana Esteves. Generation of hybrids of *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn. and effects on growth of *Eucalyptus* "urograndis" and activity against phytopathogenic fungi. 2002, 92 p, (Doctoral Thesis in Phytopatology), Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

Monocariotic cultures obtained from basidiospore germinating collected in *Eucalyptus* sp. populations were crossbred obtaining dicariotic cultures. The effects of these on the *Eucalyptus* "urograndis" and on the absorption of phosphorus and nitrogen were evaluated. These isolates were cultivated in laboratory and then inoculated in *Eucalyptus* seedlings 85 days old. Plantlets 203 days old were evaluated considering the total height, stem diameter, weight of the dry aerial part and dry roots, part of these roots was separated to determine the percentage of mycorrhizal. The concentration and contents of phosphorus and nitrogen in the leaves were also evaluated. Positive effects of the inoculation and significant differences among the isolates were observed. The significance of general crossbreeding capacity was observed while the specific crossbreeding capacities were not significant. These results allow to conclude that the genetical effects among the isolates are predominantly additives, suggesting the possibility of the use of spores as inoculation agents. In an additional experiment antifungal substances were detected in the dicariotic samples studied, using silica plates (TLC – thin layer chromatography). When the chromatograms were pulverized with *Cladosporium herbarum* spore suspension, inhibitory effects to the tested fungi were observed. Extracts of the ectomycorrhizae fungi were tested in order to verify the effect of these in inhibiting the growth of *Fusarium oxysporum*, confirming the antagonism of those substances. When the matching of the *Pisolithus microcarpus* ectomycorrhizae culture was done with a *Rhizoctonia solani* culture, the inhibitory effect of all isolates was observed. Aqueous extracts of three dicariotic isolates (D4, D6 and D7) were applied in TLC plates. In order to

Advising Committee: Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA (Major Professor); Prof^ª Dulcinéia de Carvalho – UFLA; Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA; Prof^ª Maria das Graças Cardoso – UFLA.

verify the presence of these compounds in the ectomycorrhizae extracts oxalic acid and chlorogenic acid were also applied. Comparing the Rf (retention factor) it was concluded that the extracts probably do not present these acids in their composition. It was also observed through the Rfs that the three isolates synthesized the same substances. All extracts tested were fungitoxic to *C. herbarum*. The results showed that antifungal metabolites were produced by all isolates and had fungitoxic effect on *Rhizoctonia solani* and *Cladosporium herbarum*.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A área cultivada com espécies de crescimento rápido, com destaque para o gênero *Eucalyptus*, que em 1966 não passava de 4000 ha, chega hoje aos 4,8 milhões de ha (Resende et al., 2002). Sugere-se que o déficit mundial de madeira até 2010 será da ordem de 500 milhões de m³ / ano (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1997). Sendo assim, o país deverá aumentar sua produção para atender à demanda.

Sendo considerada a espécie exótica mais importante para o país, o eucalipto está sendo cada vez mais utilizado no setor de reflorestamento, para a produção de celulose e papel, carvão para a siderurgia, madeira para a indústria moveleira, chapas, bem como seus produtos secundários (óleos essenciais e voláteis, tanino e quininas, álcool metílico, ácido acético, etc.). Em termos de ecossistema, a sua ocorrência tem sido observada na recuperação de áreas degradadas, em cultivos consorciados com plantas semi-perenes, ou mesmo em grandes extensões de monocultura. Essa vasta utilização da matéria prima, despertou o interesse de diversas empresas em relação a programas de melhoramento genético, visando ao aprimoramento de seus plantios, considerando a qualidade e a quantidade de seus produtos finais, como o carvão e a celulose.

A grande preocupação das empresas de reflorestamento é levar para o campo mudas sadias e vigorosas, uma vez que estas no campo vão passar por déficits tanto hídricos como nutricionais. Desta forma, é importante usar tecnologias alternativas, como a inoculação com fungos ectomicorrízicos, em razão das conseqüências benéficas da associação. Atualmente, há interesse em se desenvolverem estratégias para o uso desses simbioses em plantios comerciais.

O termo micorriza denomina uma associação altamente especializada entre raízes e certos fungos do solo, que melhora a capacidade de absorção e utilização dos nutrientes (Bougher et al., 1990; Thomson et al., 1994), de absorção de água, de tolerância a condições desfavoráveis do solo (Wilkins, 1991) e de resistência a microorganismos fitopatogênicos (Levishon, 1954; Marx, 1969a e b; Duchesne et al., 1988; Kope & Fortin, 1989; Newsham et al., 1995).

A produção de antibióticos por fungos ectomicorrízicos tem sido sugerida como uma forma de proteção contra infecções radiculares causadas por fitopatógenos (Zak, 1964). Produção esta, que *in vitro*, tem sido observada em mais de 100 espécies de fungos (Kope & Fortin, 1989).

As micorrizas podem ser classificadas em cinco tipos de acordo com a estrutura e os simbiosites envolvidos: micorrizas vesículo-arbusculares (MVA), ectomicorizas, ectendomicorizas, micorrizas orquídeas, micorrizas ericóides (Smith & Read, 1997).

Os fungos ectomicorrízicos, que são formados, na sua grande maioria por Basidiomicetos, são encontrados em abundância em muitas espécies florestais, principalmente nas dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Esses fungos são estimulados pelas raízes do hospedeiro, podendo infectá-lo e formar simbiose, colonizando-a internamente, formando a rede de Hartig ao redor das células corticais e externamente o manto fúngico, que fica em contato direto com o solo, promovendo assim, um melhor crescimento das plantas. Embora frequentes em povoamentos florestais, esses fungos variam em compatibilidade e eficiência, dependendo das espécies simbiosites e das condições ambientais (Garbaye, 1990; Smith & Read, 1997).

O sucesso da aplicação das ectomicorizas em florestas depende da disponibilidade de uma série de fungos capazes de melhorar de forma

economicamente viável a produção de árvores em vários ambientes e da habilidade do fungo como inóculo (Kuek et al., 1992).

Para a seleção de estirpes eficientes, torna-se necessária a condução de estudos genéticos e fisiológicos com fungos ectomicorrizicos, os quais podem ser melhor conduzidos, utilizando-se culturas dicarióticas, geradas por cruzamentos entre culturas monocarióticas, originadas pela germinação de um único esporo (Kope & Fortin, 1990b).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de culturas híbridas de *Pisolithus microcarpus* no crescimento de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" e detectar substâncias antifúngicas sintetizadas por essas culturas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações Gerais

As associações entre ectomicorrízicas em eucalipto têm sido estudadas por diversos pesquisadores há várias décadas, e foram mencionadas, pela primeira vez, por Van des Bijl, em 1917 (Mullette, 1976). Diversos fungos ectomicorrízicos têm sido identificados como simbiosites de *Eucalyptus*, sendo classificados geralmente como Basidiomicetos e, mais raramente, Ascomicetos. Os gêneros mais comuns são *Boletus*, *Lycoperdon*, *Scleroderma*, *Cenococcum*, *Hydnangium*, *Hymenogaster*, *Laccaria*, *Paxillus*, *Cortinarius*, *Inocybe*, *Mesophelia* e *Pisolithus* (Trappe, 1962 e 1964; Chu-Chou & Grace, 1982).

Pryor (1956b), estudando os efeitos do fungo micorrízico *Scleroderma flavidum* sobre o crescimento de algumas espécies de eucalipto, observou crescimento vigoroso e desenvolvimento de micorrizas nas raízes. As mudas plantadas em solo não inoculado mostraram-se cloróticas, pouco vigorosas e com ausência total de micorrizas.

Bakshi (1966), na Índia, estudando a incidência de micorrizas, encontrou frutificações de *Scleroderma verrucosum* em raízes de diversas espécies de eucalipto. O autor observou micorrizas ectotróficas nas raízes, porém sua presença não estava associada ao crescimento vigoroso das plantas. Nesse mesmo ano na Itália, Anderson (1966) detectou oito tipos distintos de micorrizas em *Eucalyptus grandis* e quatro tipos em *E. globulus* e *E. camaldulensis*. Chilvers & Pryor (1973) observaram, também, a presença de micorrizas em algumas espécies de eucalipto e identificaram alguns dos fungos encontrados como *P.tinctorius*, *Cenococcum graniforme* e duas espécies de *Boletus* não identificadas.

Marx (1977) detectou *P. tinctorius* em *E. grandis*, *E. robusta*, *E. microcorys*, em mais dez espécies, em vários países, inclusive no Brasil.

No Brasil, Barros et al. (1978) sugeriram que *Pisolithus spp.* e *Scleroderma spp.* são os gêneros, que mais formam micorrizas em espécies de eucalipto e são mais comumente encontrados no centro - leste e leste brasileiro.

Segundo Trappe (1977), o uso de culturas puras de micélio vegetativo de fungo micorrízico é provavelmente o melhor método para inocular espécies florestais em viveiro.

Pisolithus, pertence à subdivisão Basidiomycotina, classe Holobasidiomycetes, subclasse Gasteromycetidae, ordem Sclerodermatales e família Sclerodermataceae (Lacaz et al., 1996), tem sido o fungo mais utilizado como inoculante, por apresentar facilidade de crescimento em meio de cultura, forma micorriza de cor marrom dourada, facilitando o reconhecimento durante o processo de avaliação dos resultados de inoculação e por ser uma espécie amplamente distribuída geograficamente e capaz de se estabelecer em solos com baixa fertilidade natural e com reduzida quantidade de matéria orgânica (Le Tacon et al., 1987).

Vários pesquisadores têm desenvolvido métodos para a produção de inóculo vegetativo. As primeiras tentativas foram efetuadas por Moser (1958), que inoculou mudas de *Pinus cembra* com *Suillus plorans* em viveiro (Le Tacon et al., 1985). Esses mesmos autores sugeriram que vermiculita, turfa e solução nutritiva formam um excelente substrato para a produção de micélio de fungo ectomicorrízico, e que é fácil a produção por esse método para estudos científicos, mas a aplicação em larga escala tem sido dificultada pela falta de quantidades suficientes de inóculo. Abreu (1994), trabalhando com o isolado 185 de *Pisolithus tinctorius*, obteve uma grande profusão de micélio utilizando, também, turfa, vermiculita e solução nutritiva como substratos para inoculação de mudas de *Pinus caribae* e *P. oocarpa*. A autora observou que as mudas

micorrizadas cresceram mais que as não micorrizadas, e *Pinus caribae* apresentou um melhor crescimento que *P. oocarpa*, nas mesmas condições.

Muitas espécies de *Eucalyptus* crescem rapidamente e produzem grandes quantidades de madeira em plantações bem manejadas, dentro e fora de seu habitat natural. Existem também, muitas espécies de *Eucalyptus*, que podem crescer em locais pobres em nutrientes, especialmente naqueles deficientes em nitrogênio e fósforo. A inoculação controlada com fungos micorrízicos selecionados, antes do plantio, poderá ser promissora, quando a cultura for implantada nesses locais (Lapeyrie et al., 1992).

Grazziotti (1999) estudou o comportamento de espécies de *Eucalyptus* spp, *Pinus* spp e *Acacia mangium* em solo com excesso de metais pesados, e observou que a colonização por fungos ectomicorrízicos foi reduzida em todas as espécies em solo contaminado, sendo que *A. mangium* e *Eucalyptus grandis*, espécies tolerantes, apresentaram maior colonização em presença de contaminação elevada.

Alves et al. (2001) estudaram o efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *E. dunnii* e observaram que a inoculação proporcionou colonização das raízes e aumento da matéria seca da parte aérea e do conteúdo de fósforo em função da concentração do inoculante. O maior valor foi obtido com 10% do inoculante, sendo que o peso das plantas foi 73% superior ao das testemunhas, e o teor de P, 130%.

2.2 Síntese de ectomicorrizas em eucalipto

A obtenção de micorrizas, através de inoculação artificial com esporos, foi obtida por Pryor (1956a e 1956b), em três espécies de eucalipto, com esporos de *Scleroderma flavidum*, demonstrando ainda que a presença do fungo era fundamental para o desenvolvimento dessas espécies, pois em solo esterilizado não inoculado, as mudas apresentavam-se cloróticas e pouco vigorosas.

Reddy & Khan (1972), com o objetivo de estudar a especificidade da flora micorrizica em relação ao hospedeiro, inocularam solos naturais coletados de talhões de *Pinus roxburhii*, *Eucalyptus* sp e *Shorea robusta* em mudas dessas espécies citadas. Os autores observaram que o solo coletado de talhões de eucalipto induziu a formação de micorrizas em *Eucalyptus* sp, *Pinus kesiya* e *P. roxburghyi*, e uma incidência muito baixa em *P. patula* e *P. banksiana*. Mudas de *Eucalyptus* sp. apresentaram micorrizas quando inoculadas com solos de *P. roxburghii* e *Eucalyptus* sp.

Em 1976, Mullette, usando como inóculo basidiocarpo maduro e moído de *P. tinctorius*, induziu a formação de ectomicorrizas, em grande quantidade, em *E. gummifera*, em condições de casa-de-vegetação.

Grenville et al. (1986), testando a infectividade de cinco raças de *P. tinctorius* em plântulas de *E. pilulares*, observaram que os isolados de crescimento mais rápido formaram micorrizas no quarto dia após a inoculação, enquanto que os de crescimento mais lento após o oitavo dia. Nesse mesmo ano, Chilvers et al. (1986), trabalhando com duas espécies de fungos ectomicorrizicos, *Pisolithus tinctorius* e *Paxillus involutus*, obtiveram a síntese de ectomicorrizas em uma semana, através do uso da técnica de papel sanduíche. Segundo os autores, 50% das raízes de mudas de *E. globulus* foram colonizadas em duas semanas.

Vida (1989), trabalhando com plântulas e “plantlets” de *E. grandis*, *E. urophylla* e um híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* inoculados com vários isolados de *P. tinctorius*, concluiu que *E. urophylla* foi mais susceptível do que *E. grandis* à colonização ectomicorrizica pelos seis isolados de *P. tinctorius* testados.

Lei et al. (1990), comparando os estágios iniciais de formação de micorrizas em *Eucalyptus urophylla* usando dois isolados de *P. tinctorius*, um isolado de *Pinus* e o outro de eucalipto, observaram diferenças maiores na interface fungo – raiz. Dois a quatro dias após a inoculação, as células radiculares de eucalipto em contato com os isolados de *Pinus* desenvolveram uma parede celular adensada, enquanto o isolado de eucalipto estava associado ao acúmulo de fibrilas extracelulares. Quatro dias após a inoculação de eucalipto, a atividade de fosfatase ácida foi detectada. Essa atividade não foi detectada nos isolados de *Pinus*. A atividade de fosfatase foi detectada em ambos os isolados, quando em contato com raízes de eucalipto. Segundo os autores, isso sugere que o reconhecimento do fungo pelo hospedeiro pode ser manifestado em poucas horas após a inoculação. Estudos *in vitro* reportados por Malajczuk et al. (1990), comparando o processo de formação micorrizica em *Eucalyptus* e *Pinus*, demonstraram maiores diferenças na colonização de raízes de *E. urophylla* com isolados de *P. tinctorius*. O isolado de eucalipto formou micorrizas mais rapidamente que o isolado de *Pinus*, sugerindo que os estágios iniciais da interação são os passos principais para o desenvolvimento de uma simbiose eficiente.

Burgess et al. (1994), testando vinte isolados de *P. tinctorius* em *E. grandis*, observaram resultados semelhantes aos de Grenville et al. (1986), sugerindo que, geralmente o isolado mais agressivo *in vitro* e com maior taxa de desenvolvimento micorrizico, também proporciona maior estímulo no crescimento das mudas no viveiro.

Grazziotti (1995), estudando a colonização de raízes de clones de híbridos de eucalipto, por fungos micorrízicos, observou que a existência de diferenças na suscetibilidade de clones de três híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* à colonização por *P. tinctorius* e *Glomus fasciculatum* é consistente com a hipótese de que o solo e o clone podem condicionar a intensidade de colonização e o efeito desta no crescimento e nutrição da planta. Inoc

Em 1996, Galli, trabalhando com mudas de *E. citriodora* inoculadas com *P. tinctorius*, observou grande variação na formação de micorrizas entre as combinações do fungo micorrízico e espécies de eucalipto. A melhor combinação, que obteve maior quantidade de micorrizas, tanto *in vitro*, quanto no viveiro, foi a do isolado 1604 com a espécie *E. citriodora*, obtendo em média, 95% de formação de manto fúngico *in vitro* e 50% após noventa dias em condições de viveiro.

2.3 Importância da fertilidade do solo na micorrização

Diversos autores têm sugerido que altos teores de fósforo no solo inibem a micorrização. O mecanismo pelo qual a concentração de nutrientes no solo ou na planta influencia o desenvolvimento de ectomicorrizas não é muito conhecido. Algumas hipóteses foram propostas, objetivando explicar como altos conteúdos de fósforo no interior da planta controla a formação de micorrizas arbusculares.

Segundo Mosse et al. (1981), plantas micorrizadas crescem melhor em solos pobres em nutrientes devido, na maioria dos casos, a maior absorção de nutrientes, que são relativamente imóveis no solo, como o fósforo; e são aparentemente capazes de utilizar melhor formas pouco solúveis desse nutriente. Habilidade essa que parece ser atribuída a um contato maior das hifas com as partículas de fosfato e uma diminuição de P na solução, o que

proporcionaria maior gradiente de concentração e maior solubilidade do fosfato, Haymn & Mosse (1972).

Mulette (1976) sugeriu que a formação de micorrizas por *P. tinctorius* foi afetada pela concentração de fósforo no substrato. Resultado semelhante foi observado por Marx et al. (1977), que concluíram que altos teores de N, P e K diminuíram os teores de açúcar nas raízes, reduzindo, assim, a susceptibilidade do *Pinus* ao desenvolvimento da ectomicorriza.

Segundo Menge et al. (1978), altos teores de P no solo reduzem a colonização micorrízica, devido ao aumento nos teores desse elemento na planta. Esse efeito pode ser explicado por uma possível redução na permeabilidade e exsudação de metabólitos nas membranas, ou pelo efeito no metabolismo de carboidratos na planta (Siqueira et al., 1984).

2.4 Importância das ectomicorrizas na absorção de fósforo e nitrogênio

Muitos trabalhos têm mostrado que plantas micorrizadas absorvem mais nutrientes do que as não micorrizadas. A eficiência das associações micorrízicas na absorção de fósforo está baseada na produção de enzimas por parte do fungo, além de fatores edafoclimáticos, que são capazes de solubilizar os ortofosfatos do solo, tornando-os disponíveis para as plantas. Segundo Tate (1984), a atividade dessas enzimas é determinada, dentre outros fatores, pela concentração de fósforo do meio.

Soares (1986) observou que a formação das ectomicorrizas em *Eucalyptus grandis* foi totalmente inibida nos tratamentos em que a concentração de fósforo disponível em solo argilo-arenoso foi superior a 13 mg Kg⁻¹. Segundo o autor, a inibição seria consequência da redução na exsudação de metabólitos requeridos para sustentar o processo de infecção e colonização das raízes pelos fungos micorrízicos. Esse mesmo autor, em 1989, observou que

mudas de eucalipto absorveram uma maior quantidade de nutrientes, comparadas com as não inoculadas.

Heinrich et al. (1988) observaram que a inoculação de plântulas de eucalipto com *Pisolithus tinctorius* aumentou a aquisição de fósforo e produção de matéria seca das plântulas quando a disponibilidade de fósforo era limitante. Nesse mesmo ano, Vieira & Peres (1988), estudando a seleção de fungos micorrízicos para *Eucalyptus grandis*, observaram que todos os isolados de *P. tinctorius* formaram ectomicorrizas, nos dois níveis de fósforo utilizados. No nível de 3,3 ppm de P extraível por Mehlich 1 (23 ppm de P aplicado), as percentagens de ectomicorrizas de todos os isolados foram altas. No nível mais alto de P (13,4 ppm de P extraível), houve uma variação significativa na percentagem de ectomicorrizas entre os isolados.

Thomson et al. (1994), trabalhando com 47 isolados de 16 diferentes gêneros de fungos ectomicorrízicos, sugeriram que as espécies que promoveram maior absorção de fósforo e crescimento de *Eucalyptus globulus* foram *D. maculata*, *H. westraliense*, *L. laccata* e *P. tinctorius*.

Oliveira et al. (1998), estudando o efeito de micorrizas arbusculares e *Pisolithus tinctorius* na absorção de fósforo e nitrogênio em mudas de *E. grandis*, *E. pellita*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. cloeziana*, observaram que, 100 dias após o transplante, as mudas inoculadas com FMA e *P. tinctorius* apresentaram, em média, 45% e 71% de colonização radicular, respectivamente. Observaram também aumentos na absorção de N e P pelas mudas colonizadas por fungos micorrízicos. A associação de mudas de eucalipto com isolado de *P. tinctorius* resultou em aumentos de 74% e 51,6% no conteúdo de N e P na parte aérea respectivamente, enquanto as plantas colonizadas por FMA apresentaram 95% e 94% de acréscimo no conteúdo destes nutrientes. Trajano (1998) observou que as raízes das plantas inoculadas foram colonizadas por *Pisolithus* sp em todas as doses de fósforo testadas, sendo que a percentagem de

colonização decresceu com o aumento das doses de fósforo. O autor sugeriu também que as plantas inoculadas foram mais eficientes na utilização do fósforo para a produção de matéria seca da parte aérea do que as não inoculadas até a dose estimada de 145,2 mg Kg⁻¹ de fósforo. A formação de micorrizas foi afetada pela disponibilidade de fósforo no solo e pelo conteúdo de fósforo na planta.

2.5 Ectomicorrizas no controle de patógenos radiculares

A importância de fungos ectomicorrízicos no controle de patógenos radiculares vem sendo estudada há várias décadas. Raízes de plantas podem ser protegidas contra fitopatógenos pela presença de ectomicorrizas, formando uma barreira física, química ou competindo com os patógenos (Zak, 1964).

Diversos pesquisadores têm mostrado a influência das ectomicorrizas no controle de patógenos de raízes. Um dos primeiros trabalhos mostrando o efeito das ectomicorrizas no controle de patógenos radiculares foi feito por Levisohn (1954), que observou que raízes de várias espécies de *Pinus* foram resistentes à infecção por *Rhizoctonia* sp e que o patógeno infectou facilmente raízes não micorrizadas. A autora observou que o desenvolvimento de haustórios por esse patógeno foi mais comum em raízes não micorrizadas.

Algumas substâncias produzidas por fungos ectomicorrízicos têm sido detectadas em muitos estudos. Marx (1969a) observou o antagonismo entre o fungo ectomicorrízico, *Phytophthora* e bactérias do solo. Em placas com agar, os fungos *Laccaria laccata*, *Lactarius deliciosus*, *Leucopaxillus cerealis*, *Suillus luteus* e *Pisolithus tinctorius* inibiram o crescimento de aproximadamente metade de 48 fungos patogênicos de raízes. O autor concluiu que culturas de *Leucopaxillus cerealis* inibiram também o crescimento de

Phytophthora cinnamomi e bactérias do solo. A germinação de zoósporos foi inibida completamente em filtrados desse simbionte e que a produção de antibióticos ocorreu durante a fase de crescimento da cultura. Dando continuidade aos trabalhos anteriores, Marx & Davey (1969) observaram a influência de ectomicorizas na resistência de raízes de *Pinus* e sugeriram que a substância diatretine, produzida pelo fungo ectomicorrízico, pode ter conferido resistência às raízes.

Sylvia & Sinclair (1983b) observaram o potencial do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* em inibir *Fusarium oxysporum* e a influência no desenvolvimento de novas mudas. *Laccaria laccata* inibiu o crescimento do patógeno e causou distorção de hifas de *F. oxysporum*. Segundo Sylvia & Sinclair (1983a), uma raça de *Laccaria laccata*, que pode proteger raízes primárias de *Pseudotsuga menziesii* de raízes infectadas por *F. oxysporum*, induziu um acúmulo de materiais osmofílicos em células corticais e raízes primárias. Testes histoquímicos demonstraram que esses materiais eram primariamente compostos fenólicos e que a infecção cortical pelo patógeno foi significativamente menor em mudas infectadas pelo fungo ectomicorrízico ou por seus metabólitos. A frequência de hifas foi inversamente proporcional à concentração de materiais osmofílicos. A velocidade de crescimento do patógeno nas raízes e a intensidade de colonização não foi influenciada por *L. laccata*. Segundo os autores, a indução de fenólicos pela ectomicorriza em raízes primárias pode ser a base para a proteção de raízes.

Duchesne et al. (1988), estudando o efeito do exsudato de raízes de *Pinus resinosa*, na síntese de compostos antifúngicos pelo fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus*, observaram que a inoculação de raízes de *Pinus* com *P. involutus* suprimiu em 80% a esporulação do patógeno quando comparada com a testemunha sem a ectomicorriza. O aumento da resistência de *Pinus resinosa* a *Fusarium*, associado com *P. involutus* pode, portanto, ser o

resultado da biosíntese de compostos antifúngicos por *P. involutus*, que é estimulado pelo exsudato de raiz de *Pinus resinosa*.

Marx (1973) sugeriu que a síntese e o acúmulo de compostos antifúngicos por fungos ectomicorrízicos têm sido reportados em mais de 90 espécies de fungos ectomicorrízicos. Duchesne et al. (1989) inocularam mudas de *Pinus resinosa* com *Paxilus involutus*, e identificaram o ácido oxálico como um componente fungistático e/ou fungitóxico da rizosfera. A inoculação simultânea de mudas de *P. resinosa* com ácido oxálico e suspensão de esporos de *F. oxysporum* protegeu as mudas contra o patógeno e diminuiu a esporulação do patógeno na rizosfera, quando comparados com a testemunha sem o ácido oxálico.

Kope & Fortin (1989) testaram 16 culturas de fungos ectomicorrízicos, com o objetivo de verificar a habilidade desses fungos em produzir metabólitos antibióticos em cultura pura e descrever as mudanças na morfologia das hifas dos fungos antagonistas testados. Os autores observaram que os fungos ectomicorrízicos inibiram o crescimento de 20 dos 24 fitopatógenos testados. O fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* causou mudanças na morfologia das hifas em dez dos fitopatógenos testados. Os mesmos autores observaram que o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* secretou um metabólito, que inibiu a germinação de conídio de uma série de fungos patogênicos. O período ótimo de incubação para a produção do metabólito de *P. tinctorius* em cultura líquida foi de 42- 56 dias. Diluições do filtrado da cultura com meio causou um gradiente de efeito inibitório (Kope & Fortin, 1990a). Dando sequência aos trabalhos, Kope et al. (1991) isolaram dois compostos antifúngicos de meio de cultura líquido de *Pisolithus tinctorius* e identificaram como ácido fórmico p- hidroxibenzol e ácido (R) - (-) -p- hidroximandélico (Pisolitina A e Pisolitina B, respectivamente). Segundo os autores, a eficácia dos compostos a inibir a germinação de conídios de

Truncatella hartigii foi comparada com um produto comercial análogo, e a taxa da efetividade foi de 50% de inibição de germinação de conídios. Tsantrizos et al. (1991) isolaram também esses mesmos compostos (Pisolitina A e Pisolitina B) de culturas de *Pisolithus tinctorius* e observaram que ambos os metabólitos e outros poucos compostos relatados foram apresentados por inibir germinação de esporos e causarem ruptura de hifas de um número significativo de fungos fitopatogênicos e dermatogênicos. Os autores concluíram que *P. tinctorius* ajuda as plantas hospedeiras por fornecer proteção contra microorganismos causadores de doença.

Suh et al. (1991) detectaram a produção de substâncias antifúngicas em *Pisolithus tinctorius*. Em meio sólido, o fungo ectomicorrízico inibiu o crescimento de raças de *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Verticillium dahliae*. Segundo os autores, há evidências de que os estudos de inibição de crescimento de colônias pareadas em placas com ágar indicaram que a produção de substâncias antifúngicas por *P. tinctorius* pode ser dependente do contato físico com outros fungos. A atividade antifúngica foi associada a uma aparente indução do metabolismo de *P. tinctorius* com a produção de metabólitos fenólicos solúveis em água, de coloração escura.

Farquhar & Peterson (1991) verificaram o efeito do fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* em mudas de *Pinus resinosa* na presença do patógeno *Fusarium oxysporum* e concluíram que raízes de mudas inoculadas com *P. involutus* continham poucas hifas do patógeno. Em contraste, raízes de mudas não inoculadas com *P. involutus* foram extensivamente colonizadas por *F. oxysporum*, ocorrendo desorganização dos tecidos do hospedeiro. Nesse mesmo ano, Chakravarty et al. (1991) observaram que o número de unidades formadoras de colônias (c.f.u.) de *Fusarium* spp foi reduzido significativamente em extratos de raízes e substrato da rizosfera de mudas de *Pinus resinosa* inoculadas com o fungo ectomicorrízico

Paxillus involutus. A germinação de esporos de *Fusarium* spp foi reduzida significativamente quando tratados com filtrados de cultura de *P. involutus* e extrato de raízes de mudas de *Pinus resinosa*, inoculadas com o fungo ectomicorrízico. A sobrevivência das mudas teve um aumento significativo quando desenvolvidas *in vitro* concomitantemente com *P. involutus* e *Fusarium moniliforme*, ou *Paxillus involutus* e os três isolados de *F. oxysporum*, comparados com mudas inoculadas com ambos os patógenos isoladamente. *P. involutus* não apresentou efeito protetor contra *Cylindrocarpon destructans*. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Chakravarty & Hwang (1991) testaram o efeito do fungo micorrízico *Laccaria laccata* em mudas de *Pinus banksiana* com o patógeno *Fusarium oxysporum*. *L. laccata* protegeu 37,7% das mudas, na presença do patógeno. A sobrevivência das mudas foi significativamente maior quando inoculadas com *L. laccata*. O número c.f.u. de *F. oxysporum* foi significativamente reduzido no extrato da rizosfera de mudas inoculadas com o fungo ectomicorrízico. A quantidade total de fenóis em mudas micorrizadas foi significativamente maior que mudas não micorrizadas.

Rasanayagam & Jeffries (1992) investigaram a interação de *Pythium ultimum* com uma variedade de fungos ectomicorrízicos *in vitro*. Dos 19 isolados ectomicorrízicos testados, 16 causaram dilatação e ruptura de hifas do patógeno. O crescimento de hifas de *P. ultimum* foi inibido em pH abaixo de 3. Em cultura líquida, o fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* reduziu o pH do meio a menos de 3, depois de atingir a fase estacionária. Segundo os autores, isso sugere que o efeito antibiótico exibido por alguns fungos ectomicorrízicos é devido à produção de ácidos. Análises em HPLC de filtrados de *P. involutus* não revelaram presença de ácido oxálico, mas outros ácidos estavam presentes em grandes quantidades.

Burgess et al. (1995) verificaram o efeito da agressividade do isolado fúngico na biossíntese de polipeptídeos em diferentes fungos ectomicorrizicos em eucalipto e sugeriram que mudanças na biossíntese de proteínas foram examinadas durante os estágios iniciais de diferenciação de *P. tinctorius* – *Eucalyptus grandis* através de eletroforese. Foram testados 3 isolados de *P. tinctorius*. O isolado H506 não foi capaz de formar micorrizas, enquanto que o 441 apresentou moderada infectividade e o isolado H2144 exibiu uma alta infectividade. O isolado não micorrizico não causou mudanças na biossíntese de proteínas nas raízes. Nesse mesmo ano, Hwang et al. (1995) testaram *in vitro* o efeito de dois fungos ectomicorrizicos, *Paxillus involutus* e *Suillus tomentosus* e de *Bacillus subtilis* em mudas de *Pinus banksiana* com *Fusarium moniliforme* (*Giberella fujikuroi*). Ambos, *P. involutus* e *B. subtilis*, inibiram o crescimento de *G. fujikuroi*, agente causal do tombamento de mudas de *P. banksiana*. Os filtrados das culturas de *P. involutus* e *B. subtilis* foram tóxicos ao patógeno, embora tenha sido observada a formação de clamidósporos do patógeno. *S. tomentosus* não inibiu o crescimento *in vitro* do patógeno e não aumentou a sobrevivência das mudas. *G. fujikuroi* reduziu a formação das ectomicorrizas em mudas. O número de c.f.u do patógeno foi reduzido quando as mudas foram inoculadas com *Paxillus involutus* e *B. subtilis* isoladamente ou em combinação. A supressão do patógeno envolveu a produção de compostos antifúngicos:

Kasuya et al. (1996) observaram a presença de compostos com atividade antimicrobiana em extratos de fungos ectomicorrizicos. Extratos de *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma flavidum*, *Amanita pantherina* e *Paxillus* sp., cultivados em meio de cultura líquido e de mudas de *P. glehnii* inoculadas ou não com fungo ectomicorrizico e cultivadas *in vitro*, foram processados para obtenção de duas frações solúveis em água e etil acetato. As frações foram testadas para a presença de constituintes inibitórios contra *Fusarium roseum*,

Pythium sp. e *Rhizoctonia solani*. Os resultados confirmaram a produção de compostos inibitórios pelos fungos ectomicorrízicos e *P. glehnii*, inoculados ou não.

Bhat et al. (1997), usando fungos ectomicorrízicos no controle de tombamento por *Pythium aphanidermatum* em *Eucalyptus tereticornis* *in vitro*, observaram que *Rhizopogon luteolus* e *P. tinctorius* (2 isolados) foram altamente antagonistas. As ectomicorrizas também reduziram o tombamento de pré-emergência, mas somente *Rhizopogon luteolus* teve algum efeito no tombamento de pós-emergência. Ambas as espécies aumentaram a biomassa das mudas, *P. tinctorius* em 29,3% e *Rhizopogon luteolus* em 15,1 %, comparado com os valores da testemunha.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. F. E. Influência de *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch no desenvolvimento de mudas de *Pinus* na presença de *Rhizoctonia solani* Kuhn, sob diferentes níveis de fósforo. 1994. 46 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A. S.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. Efeito de inoculante ectomicorrizico por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 307-313, fev. 2001.
- ANDERSON, J. Indagini sulla micorrizia in alcune specie di eucalipto nell'Itália Centrale. **Publicazione del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale**, Roma, v. 8, p. 260-276, 1966.
- BAKSHI, B. K. Mycorrhiza in eucalypts in India. **Indian Forester**, Dehra Dun, v. 92, p. 19-20, 1966.
- BARROS, N. F.; BRANDI, R. M.; REIS, M. S. Micorriza em eucalipto. **Revista árvore**, Viçosa, v. 2, n. 2, p. 130-140, dez. 1978
- BHAT, M. N. ; JEYARAJAN, R.; RAMARAJ, B. Biocontrol of damping off of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Using ectomycorrhizae. **Indian Forester**, Dehra Dun, v. 123, n. 4, p. 307-312, Apr. 1997.
- BOUGHER, N. L.; GROVE, T. S.; MALAJCZUK, N. Growth and Phosphorus acquisition of Karri (*Eucalyptus diversicolor* B. Muell) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 77-85, Jan. 1990.
- BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 127, n. 4, p. 731-739, Aug. 1994.
- BURGESS, T. ; LAURENT, P. ; DELL, B. MALAJCZUK, N.; MARTIN , Effect of fungal isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, Berlin, v. 195, n. 3, p. 408-417, Jan. 1995.

CHAKRAVARTY, P.; HWANG, S. F. Effect of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*, on *Fusarium* damping-off in *Pinus banksiana* Seedlings. *European Journal of Forester Pathology*, Berlin, v. 21, n. 2, p. 97-106, May 1991.

CHAKRAVARTY, P.; PETERSON, R. L.; BRIAN, E. E. Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*, damping-off fungi and *Pinus resinosa* seedlings. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 132 n. 3, p. 207-218, July 1991.

CHILVERS, G. A.; DOUGLASS, P. A.; LAPEYRIE, F. F. A paper sandwich Technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 103, n. 2, p. 397-402, June 1986

CHILVERS, G. A.; PRYOR, L. D. Host range of some eucalypt mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v. 21, n. 1, p. 103-111, 1973.

CHU-CHOU, M.; GRACE, L. J. Mycorrhizal fungi of *Eucalyptus* in the North Island of New Zealand. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 14, n. 2, p. 133-137, 1982.

DUCHESNE, L. C.; BRIAN, E. E.; PETERSON, R. L. Disease suppression By the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 67, n. 9, p. 2726-2730, Sept. 1989.

DUCHESNE, L. C.; PETERSON, R. L.; BRIAN, E. E. Pine root exudate stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 108, n. 4, p. 471-476, Apr. 1988.

FARQUHAR, M. L.; PETERSON, R. L. Later events in suppression of *Fusarium* root rot of red pine seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 69, n. 6, p. 1372 -1383, June 1991.

GARBAYE, J. Utilization des mycorhizes en sylviculture. In: STRULLU, D. G. (Ed.). *Les Mycorrhizes des arbres et plantes cultivées*, Paris: Lavosier, 1990. p. 197-250.

GRAZZIOTTI, P. H. Colonização de raízes de clones de híbridos de *Eucalipto* por fungos micorrízicos. 1995. 87 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GRAZZIOTTI, P. H. Comportamento de fungos ectomicorrízicos, *Acacia mangium* e espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* em solo contaminado com metais pesados. 1999. 177 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRENVILLE, D. J.; PETERSON, R. L.; ASHFORD, A. E. Synthesis in growth pouches of mycorrhizae between *Eucalyptus pilulares* and several strains of *Pisolithus tinctorius*. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v. 34, n. 1, p. 95-102, 1986.

HAYMAN, D. S.; MOSSE, B. Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increases uptake of labile from soil. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 61, n. 1, p. 41-47, Jan. 1972.

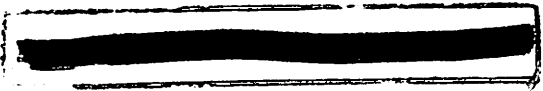
HEINRICH, P. A.; MULLIGAN, D. R.; PATRICH, J. W. The effect of mycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 109, n. 1, p. 147-149, 1988.

HWANG, S. F.; CHAKRAVARTY, P.; CHANG, K. F. The effect of two ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Suillus tomentosus*, and of *Bacillus subtilis* on *Fusarium* damping-off in jack pine seedlings. *Phytoprotection*, Quebec, v. 76, n. 2, p. 57-66, Aug. 1995.

KASUYA, M. C.; TAHARA, S.; IGARASHI, T. Growth inhibition of pathogenic root fungi by extracts of ectomycorrhizal fungi or *Picea glehnii* inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Biotropia*, Bogor, v. 9, p. 53-61, 1996.

KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. Antifungal activity in culture filtrates of the Ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 68, n. 6, p. 1254-1259, June 1990a.

KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. Germination and comparative morphology of Basidiospores of *Pisolithus arhizus*. *Mycologia*, New York, v. 82, n. 3, p. 350-357, May/June 1990b.



KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. Inhibition of phytopathogenic fungi in vitro by Cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 113, n. 1, p. 57- 63, Sept. 1989.

KOPE, H. H.; TSANTRIZOS, Y. S.; FORTIN, J. A.; OGILVIE, K. K. P- hydroxybenzoylformic acid and (R) – levo p- hidroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomy corrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 37, n. 4, p. 258-264, Apr. 1991.

KUEK, C.; TOMMERUP, I. C.; MALAJCZUK, N. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalyptus for plantations. *Mycological Research*, Cambridge, v. 96, n. 4, p. 273-277, Apr. 1992.

LACAZ, C. S.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; HERNANDEZ, ARRIAGADA, G.L. Basidiomycosis: a review of the literature. *Revista do Intituto de medicina tropical de São Paulo, São Paulo*, v. 38, n. 5, p. 379-390, Out. 1996.

LAPEYRIE, F. ; GARBAYE, J.; OLIVEIRA, V.; BELLEI, M. Controlled Mycorrhization of *Eucalyptus*. In: READ, D. J.; LEWIS, D. H.; FITTER, A. H.; ALEXANDER, I. J. *Mycorrhizas in ecosystems*, Wallengford, Cambridge University, 1992. p. 293-299.

LEI, J.; LAPEYRIE, F. MALAJCZUK, N.; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in vitro. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 116, n. 1, p. 115-122, Sept. 1990.

LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. *Symbiosis*, Rehovot, v. 3, n. 2, p. 179-206, 1987.

LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; MICHELOT, P.; MAUPERIN. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 63, n. 9, p. 1665-1668, Sept. 1985.

LEVISOHN, I. Aberrant root infections of pine and spruce seedlings. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 53, n. 2, p. 284-290, 1954.

MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. I Mycorrhiza formation in model systems. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 114, n. 4, p. 627-631, Apr. 1990.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizae fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizae fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, St Paul, v. 59, n. 2, p. 153-163, Feb. 1969a.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. *Phytopathology*, St Paul, v. 59, n. 4, p. 411-417, Apr. 1969b.

MARX, D. H. Mycorrhizae and feeder root diseases. In: MARKS, G. C.; KOZŁOWSKI. *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. New York: Academic Press, 1973. p. 351-382.

MARX, D. H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 23, n. 3, p. 217-223, Mar. 1977.

MARX, D. H.; DAVEY, C. B. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, St Paul, v. 59, n. 5, p. 549-558, May 1969.

MARX, D. H.; HATCH, A. B.; MENDICINO, J. F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 55, n. 12, p. 1569-1574, June 1977.

MENGE, J. A.; JOHNSON, E. L. V.; SPLATT, R. G. Mycorrhizal dependence of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 81, n. 3, p. 553-559, 1978.

MOSSE, B.; STRIBLEY, D. P.; LE TACON, F. Ecology of mycorrhizae and Mycorrhizal fungi. In: ALEXANDER, M. (Ed.). *Advances in microbial ecology*. New York: Plenum Press, 1981. p. 137-210.

- MULLETE, K. J. Studies of eucalypt mycorrhizas. 1. A method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus gummifera* (Gaertn & Hochr) by *Pisolithus tinctorius* (Pers & Couch). *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v. 24, p. 193-200, 1976.
- NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution*, Oxford, v. 10, n. 10, p. 407-411, Oct. 1995.
- OLIVEIRA, V. L. F.; ZAMBOLIM, L.; NEVES, J. C. L. Efeito de fungos micorrizicos na absorção de nitrogênio e fósforo em mudas de *Eucalyptus spp.* *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 24, n. 1 p. 10-17, jan./mar: 1998.
- PRYOR, L. D. Chlorosis and lack of vigour in seedlings of Renantherous species of *Eucalyptus* caused by lack of mycorrhiza. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, Sydney, v. 81, p. 91 - 95, 1956a.
- PRYOR, L. D. Ectotrophic mycorrhiza in Renantherous species of *Eucalyptus*. *Nature*, London, v. 177, n. 4508, p. 587-588, 1956b.
- RASANAYAGAM, S.; JEFFRIES, P. Production of acid is responsible for Antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research*, Cambridge, v. 96, n. 11, p. 971-976, Nov. 1992.
- REDDY, M. A. R.; KHAN, S. N. Soil amendments and types of inocula on development of mycorrhiza. *Indian Forester*, Dehra Dun, v. 98, n. 4, p. 307-310, Apr. 1972.
- RESENDE, J. L. P.; COELHO JUNIOR, L. M.; OLIVEIRA, A. D. A Economia florestal mineira vis-à-vis a economia florestal brasileira. In: SEMINÁRIO SÓLIDOS DE EUCALIPTO: Avanços científicos e tecnológicos, 1., 2002, Lavras. *Anais.....* Lavras: UFLA, 2002. p. 1.
- SIQUEIRA, J. O.; HUBBELL, D. H.; VALLE, R. R. Effect of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 12, p. 1465-1474, dez. 1984.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic, 1997. 605 p.

SOARES, I. Níveis de fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas por *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e no crescimento de mudas de eucalipto. 1986. 51 p. Dissertação (Tese em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (São Paulo). Luiz Kaufmann: setor não aproveita seu potencial. *Silvicultura*, São Paulo, v. 18, n. 69, p. 7- 11, jan./fev. 1997.

SUH, H. W.; CRAWFORD, D. L.; KORUS, R. A.; SHETTY, K. Production of antifungal metabolites by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *Journal Indian Microbiology*, Basingstoke, v. 8, n. 1, p. 29-35, July 1991.

SYLVIA, D. M.; SINCLAIR, W. A. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology*, St Paul, v. 73, n. 3, p. 390-397, Mar. 1983a.

SYLVIA, D. M.; SINCLAIR, W. A. Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and Douglas fir seedlings. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, n. 3, p. 384-389, Mar. 1983b.

TATE, K. R. The biological transformation of P in soil. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 76, n. 1/3, p. 245-256, 1984.

THOMSON, B. D.; GROVE, T. S.; MALAJCZUK, N.; HARDY, G. E. S. J. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. In relation to root colonization and hyphal development in soil. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 126, n. 3, p. 517-524, Mar. 1994.

TRAJANO, M. A. B. Suprimento de P de eucalipto com raízes subdivididas e formação de micorrizas. 1998. 43 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TRAPPE, J. M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review*, Lancaster, v. 28, p. 538- 606, 1962.

TRAPPE, J. M. Mycorrhizal hosts and distribution of *Cenococcum graniforme*. *Lloydia*, Manasha, v. 27, n. 2, p. 100-106, 1964.

TRAPPE, J. M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, v. 15, p. 203-222, 1977.

TSANTRIZOS, Y. S.; KOPE, H. H.; FORTIN, J. A.; OLGIVIE, K. K. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*, *Phytochemistry*, Oxford, v. 30, n. 4, p. 1113-1118, Apr. 1991.

VIDA, J. B. Obtenção de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus* a partir de "plantlets" e plântulas inoculadas *in vitro* com *Pisolithus tinctorius*. 1989. 140 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

VIEIRA, R. F.; PERES, J. R. R. Definição do teor de fósforo no solo para a máxima eficiência da associação ectomicorrízica em *Eucalyptus grandis*. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, Campinas, v. 12, n. 3, p. 237-241, set./dez. 1988.

WILKINS, D. A. The influence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of trees on the uptake of metals. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 35, n. 2/3, p. 245-260, Apr. 1991.

ZAK, B. Role of mycorrhizae in root disease. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 2, p. 377-392, 1964.

CAPÍTULO 2

GERAÇÃO E SELEÇÃO DE CULTURAS HÍBRIDAS DE *Pisolithus microcarpus* PARA INOCULAÇÃO EM *Eucalyptus* “urograndis”.

RESUMO

ABREU, Maria Floriana Esteves. Geração e seleção de culturas híbridas de *Pisolithus microcarpus* para inoculação em *Eucalyptus* "urograndis". 2002. Cap. 2, p. 28 - 61. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

Avaliou-se o efeito de 10 culturas dicarióticas, híbridas, do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* no crescimento vegetativo de mudas de *E. "urograndis"* e na absorção de N e P. Em uma etapa preliminar, coletaram-se esporos de frutificações procedentes de distintos sub-bosques de eucalipto. A partir desses, obtiveram-se os genitores monocarióticos monosporais, os quais foram caracterizados quanto aos grupos de compatibilidade sexual. Dentro desses grupos, foram tomados, ao acaso, cinco isolados genitores, os quais foram cruzados entre si para produzir 10 culturas híbridas intraespecíficas. O delineamento de cruzamento foi em dialelo balanceado, no qual autocruzamentos e recíprocos não foram realizados. Estas culturas foram cultivadas em meio e, posteriormente, inoculadas em mudas de *E. "urograndis"*, as quais foram avaliadas, aos 203 dias de idade, quanto ao diâmetro do colo, altura total, peso da matéria seca de raízes e parte aérea, concentração e conteúdo de N e P. Também utilizou-se um tratamento adicional (testemunha) constituído por mudas não inoculadas. Observaram-se efeitos positivos da inoculação e diferenças significativas entre as culturas híbridas. Nas análises desses efeitos, constatou-se a significância da Capacidade Geral de Cruzamento, enquanto que a diferença entre a Capacidade específica de cruzamento não foi significativa. Isso permitiu concluir que os efeitos genéticos entre os isolados são predominantemente aditivos, sugerindo a possibilidade de uso de esporos como agentes de inoculação.

*Comitê Orientador: Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA (Orientador); Prof^ª Dulcinéia de Carvalho – UFLA; Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA; Prof^ª Maria das Graças Cardoso – UFLA.

ABSTRACT

ABREU, Maria Floriana Esteves. **Generation and Selection of hybrid isolates of *Pisolithus microcarpus* for inoculation in *Eucalyptus* "urograndis"**. 2002. Chap 2, p. 32 - 67. Thesis (Doctorate in Phytopatology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

The effect of ten dicariotic, hybrid isolates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* was evaluated on the vegetative growth of *E. "urograndis"* seedlings and on the absorption of N and P. In a preliminary stage, spores from fruitbodies were collected of different eucalyptus plantations. From these spores, monosporic and monocariotic progenitors were obtained, which were characterized by groups of sexual compatibility. Within these groups five progenitor isolates were crossed to each other to produce ten intraspecific hybrid cultures. The design of crossbreeding was in a balanced dialelo, where autocrossing was not accomplished. These isolates were cultivated in medium and afterwards inoculated in 203 days old *Eucalyptus urograndis* seedlings which were evaluated in relation to stem diameter, total height, dry weight of the shoots and roots, and concentration of N and P. An additional treatment (control) constituted of non inoculated seedlings was also used. Positive effects of the inoculation and significant differences among the hybrid cultures were observed. The general crossbreeding capacity was observed while the specific crossbreeding capacities were not significant. This allowed to conclude that the genetical effects among the isolates are predominantly additive, suggesting the possibility of the use of spores as inoculating agents (sources).

Advising Committee: Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA (Major Professor); Prof^a Dulcinéia de Carvalho – UFLA; Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA; Prof^a Maria das Graças Cardoso – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A interação de genótipos de plantas em ambientes evidencia que o desempenho relativo de genótipos varia de acordo com a qualidade ambiental. Isso indica a necessidade de que tais genótipos sejam selecionados especificamente para cultivo em condições particulares de sítio. Entretanto, as condições ambientais imprevisíveis, como as flutuações climáticas, secas prolongadas e doenças, sugerem a seleção de genótipos possuidores de alta estabilidade em amplas condições de sítio (Zobel & Talbert, 1984). Os fungos micorrízicos apresentam funções reconhecidas na redução dos efeitos de condições ambientais imprevisíveis na sobrevivência e desenvolvimento das plantas. Sabe-se, por exemplo, que o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* aumenta a absorção de água e nutrientes do solo (Lamhamedi et al., 1992), melhora a qualidade do sistema radicular (Dixon et al., 1987; Rosado et al., 1994b) e produz compostos antifúngicos (Kope et al., 1991), tornando as plantas hospedeiras mais vigorosas, tolerantes às secas prolongadas e resistentes às doenças do sistema radicular.

A extensão do benefício dessas funções para as plantas é altamente influenciada pelas condições de sítios. Quanto mais inférteis e secos os solos, maiores serão os benefícios e, portanto, maior será o grau de dependência da planta em relação à micorrização (Hetrick, 1988; Manjunath & Habte, 1991). Tais fatos indicam que plantas geneticamente selecionadas e com alto grau de dependência micorrízica podem sofrer e sucumbir em condições ambientais adversas, se suas raízes não estiverem bem colonizadas por fungos micorrízicos.

Na eucaliptocultura, na qual há forte dependência micorrízica, utilizam-se materiais genéticos selecionados e massivamente clonados para cultivos em áreas normalmente predispostas a condições ambientais adversas. Tornar esses

materiais tolerantes às possíveis secas prolongadas e produtivas diante da escassez de nutrientes no solo é um desafio que pode ser vencido pela inoculação de mudas com isolados de fungos ectomicorrízicos, selecionados para aumentar a capacidade de colonização radicular, a absorção de nutrientes do solo e favorecer o desenvolvimento das mudas em condições de campo.

Alguns estudos prévios, conduzidos em *Pisolithus* (Rosado et al., 1994 a e b; Carvalho et al., 1997; Sales et al., 2000) evidenciaram a possibilidade de se obter genitores monocarióticos (n) e suas progênes dicarióticas (n+n) *in vitro*. Estudos dessa natureza possibilitam avanços no conhecimento reprodutivo desse fungo no sentido de propiciar a produção de híbridos intraespecíficos e geração de estirpes apropriadas para produção de inóculos comerciais efetivos na colonização das raízes das árvores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação genética para a capacidade de colonização, absorção de N e P e de promoção do crescimento de mudas de eucalipto, estimar os efeitos da Capacidade Geral de Cruzamento (CGC) associada a cada genitor monocariótico e da Capacidade Específica de Cruzamento (CEC) entre genitores específicos e avaliar o potencial de uso de esporos como agentes de inoculação em mudas de *Eucalyptus* em larga escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação dos departamentos de Fitopatologia e Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras , no período de fevereiro a agosto de 2001.

2.1 Obtenção do fungo ectomicorrízico

Foram utilizadas 10 culturas dicarióticas híbridas de *Pisolithus microcarpus* obtidas de cruzamentos entre culturas monocarióticas (Sales, 2001) (Figura 1 e 2). Essas foram repicadas em placas de Petri contendo meio MNM (Meio de Melin Norkrans, modificado por Marx, 1969), e incubados a 25 °C por 35 dias. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e colocados em placa de Petri contendo o mesmo meio e incubados a 25 °C por 5 dias para um pré- crescimento, e posteriormente foram utilizados para inoculação em mudas de *E. "urograndis"*.

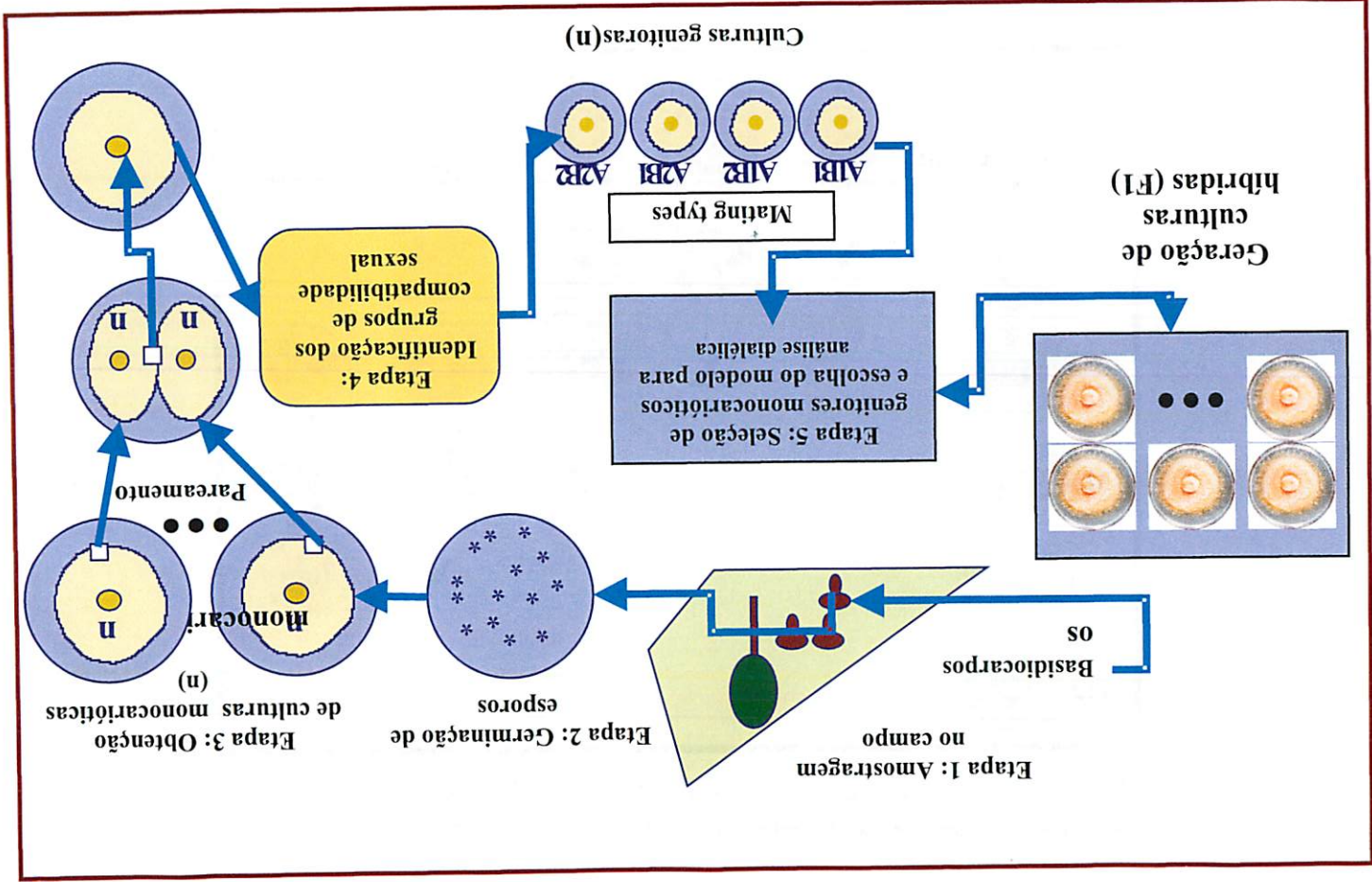


FIGURA 1. Fluxograma para execução das etapas para os cruzamentos entre genitoras e geração de culturas híbridas de *Fusarium moniliforme* (Sales, 2001).

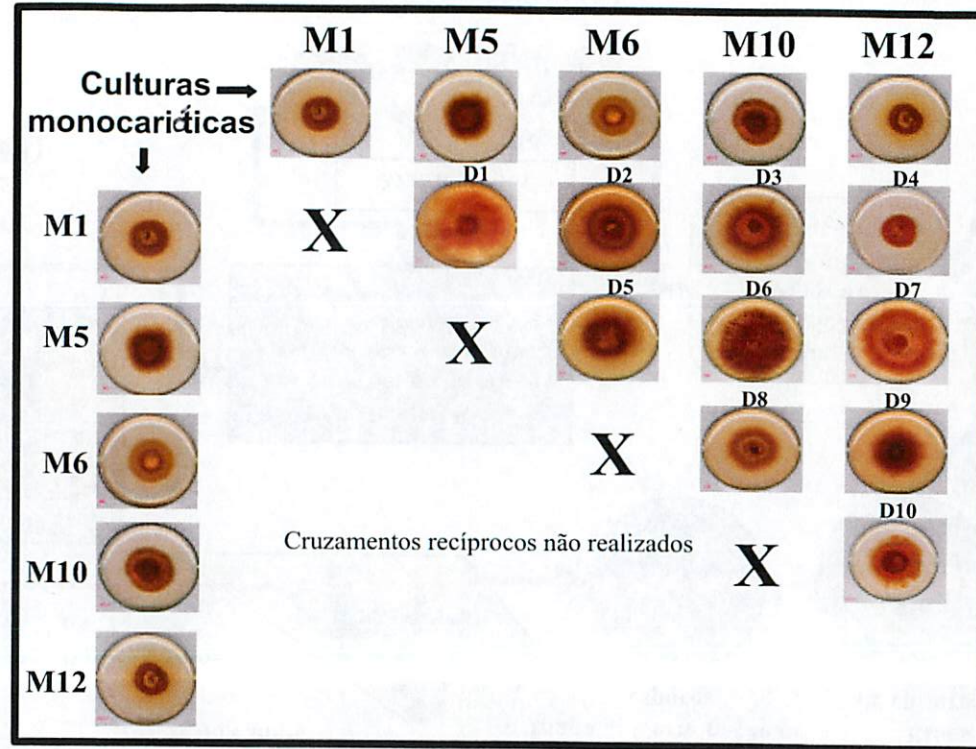


FIGURA 2. Delineamento de cruzamentos em dialelo balanceado para as estimativas das Capacidades geral e específica de cruzamento.

2.2 Preparo do substrato

O substrato utilizado para o preenchimento dos tubetes foi composto de casca de arroz carbonizada, vermiculita e terra peneirada, na proporção de 5: 3: 2 (Tabela 1). Misturaram-se ao substrato, 10 g de sulfato de amônia, 2,5 g de cloreto de potássio e 2,5 g de FTE/ 96 tubetes

TABELA 1. Características químicas do substrato utilizado no preparo das mudas de *Eucalyptus uro-grandis*, UFLA, Lavras, 2002

pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	P-rem
H ₂ O	mg/dm ³			cmol/dm ³				mg/l
5,5	9,6	526	-	1,4	3,3	0,1	2,1	30,8

2.3 Formação das mudas

Sementes do híbrido, *Eucalyptus* “urograndis”, cedidas pelo laboratório de sementes do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, foram desinfestadas em álcool a 70% por 10 minutos, em água sanitária a 70% por 1 hora, e lavadas em água deionizada esterilizada (autoclave a 121°C por 20 min.). Após foram colocadas para germinação em bandejas contendo areia esterilizada.

Após a germinação, as plântulas foram pulverizadas com solução de Clark (1975), diluída a 1/4 da concentração original, com o seguinte conteúdo normal (mM): 2,53 Ca(NO₃)₂.4H₂O; 1,3 KNO₃; 0,5 KCL; 0,9 NH₄NO₃; 0,5

MgSO₄.7H₂O; 1,5 Ca(H₂PO₄)₂.H₂O; 0,007 MnCl₂.4H₂O; 0,019 H₃BO₃; 0,002 ZnSO₄; 8,6 .10⁻⁵ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 3,0 .10⁻⁴ CuSO₄.5H₂O; 0,004 Na₂EDTA e 0.004 FeCl₃.6H₂O.

As plântulas com 53 dias de idade foram transplantadas para tubetes de 150 cm³, sendo 2 plantas por tubete, num total de 30 tubetes por bandeja, ou seja, 60 plantas por bandeja.

Trinta e dois dias após o transplântio, as mudas foram inoculadas com discos de micélio de *P. microcarpus*. Foi colocado um disco por planta em contato com as raízes das plântulas, um , sendo inoculada somente uma muda por tubete.

2.4 Condução e avaliação do experimento

O experimento constou de 11 tratamentos, sendo uma espécie de eucalipto, 10 isolados dicarióticos de fungos ectomicorrízicos e testemunha não inoculada. Empregaram -se 4 repetições, e cada parcela com 15 plantas. O delineamento foi inteiramente casualizado.

Quatro meses após o transplântio, as plantas não inoculadas de cada tubete foram cortadas na altura do solo, deixando somente uma muda / tubete, restando 30 plantas/ bandeja.

Após trinta dias, todas as mudas foram medidas quanto à altura e ao diâmetro do colo e, em seguida, foram retiradas dos tubetes, e lavadas em água corrente. Separou-se uma amostra de cinco plantas por tratamento para a avaliação de colonização micorrízica. Para essa avaliação, foram coletadas amostras de raízes finas, nos terços superior, intermediário e inferior do sistema radicular, obtendo-se, assim, uma amostra composta. Essas amostras foram preservadas em formalina- álcool- ácido acético (FAA) até a avaliação da colonização micorrízica, segundo a metodologia de Giovanetti & Mosse (1980).

Quinze plantas de cada tratamento foram separadas para determinação de peso seco de raízes e parte aérea e determinação do teor de fósforo e nitrogênio presentes nas folhas.

Os dados de taxa de colonização diâmetro do colo, altura total das mudas, peso seco do sistema radicular e da parte aérea foram coletados aos 203 dias e submetidos à análise de variância conforme o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + S_{ij} + e_{ij}$$

Sendo, Y_{ij} = média da $i^{\text{ésima}}$ cultura dicariótica híbrida na $j^{\text{ésima}}$ repetição.

μ = efeito da média geral;

G_i = efeito da Capacidade Geral de Cruzamento (CGC) associados à $i^{\text{ésima}}$ cultura genitora monocariótica– efeito aleatório;

S_{ij} = efeito da Capacidade Específica de Cruzamento (CEC) entre genitores monocarióticos;

e_{ij} = erro aleatório médio, associado ao tratamento de ordem ij .

Para a realização dessas análises utilizou-se o programa GENES (Cruz, 1997).

As culturas monocarióticas paternas (M1, M5, M6, M10 E M12) não foram inoculadas em plantas de *E. uro-grandis*. Fez-se a análise genética, a fim de se estudar as capacidades geral e específica de cruzamento.

Segundo Falconer (1966), citado por Zobel & Talbert (1984), Capacidade Geral de Cruzamento é a performance média de uma progênie de um indivíduo, quando este é cruzado com vários outros, em uma população, já Capacidade Específica de Cruzamento é a performance média de um cruzamento entre dois progenitores específicos.

2.5 Eficiência micorrízica

A eficiência micorrízica é um índice que traduz a contribuição das micorrizas para o acúmulo de matéria seca da parte aérea ou de outro parâmetro de crescimento, e foi calculada utilizando a fórmula:

$$EM = [(IN - NI) / NI] \times 100$$

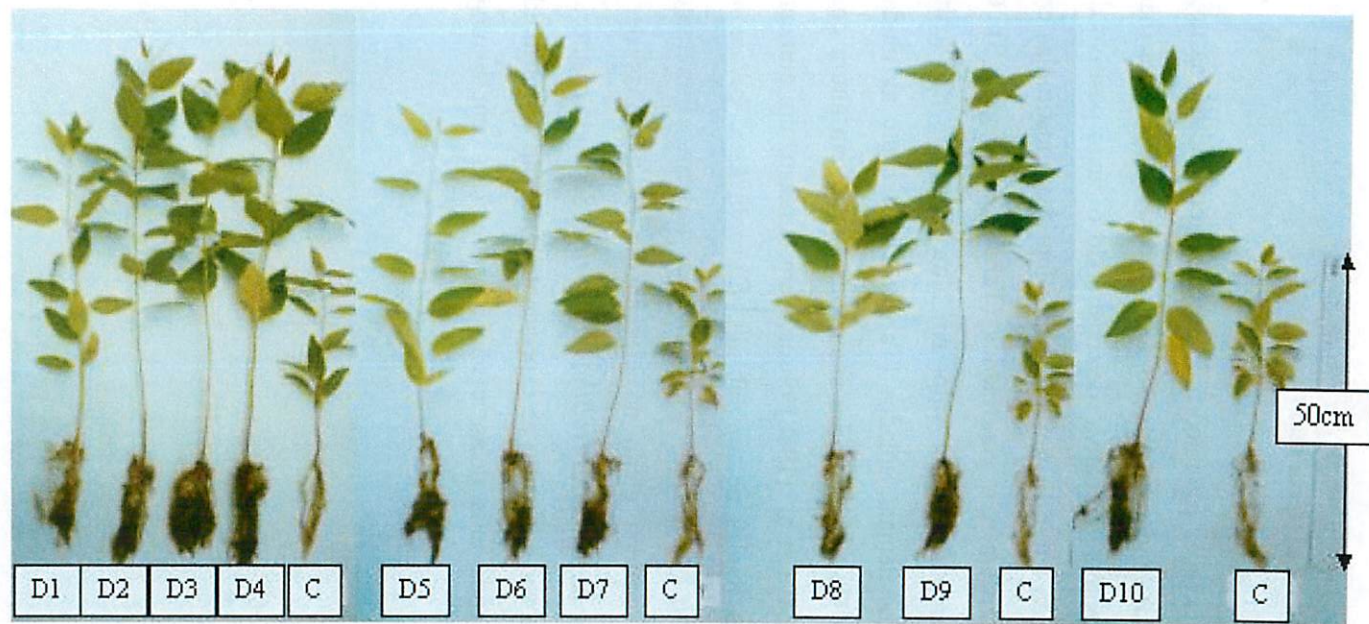
IN - Matéria seca da parte aérea das plantas inoculadas (g)

NI - Matéria seca da parte aérea das plantas não inoculadas (g)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento e produção de matéria seca

A capacidade dos isolados ectomicorrízicos em exercer efeitos na taxa de crescimento em altura das mudas, em relação ao tratamento testemunha (não inoculado), foi estatisticamente significativa, demonstrando o efeito positivo da inoculação e/ou uma variação natural entre as estirpes híbridas constituídas em laboratório por meio de cruzamentos controlados (Tabela 2 e Figura 3). O isolado D4 foi o que propiciou maior valor em altura, embora não tenha diferido estatisticamente dos demais isolados (Tabela 2). Somente as mudas inoculadas com o isolado D8 não diferiram significativamente em altura com relação à testemunha. Garbaye et al. (1988) observaram também um aumento significativo na altura das mudas de um híbrido, *E.urophylla* x *kirtomana* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma texense*. Entretanto, Comerlato (1992) não verificou efeito no crescimento de plântulas de 5 espécies de *Eucalyptus* inoculadas com *Pisolithus tinctorius*. Segundo o autor, a diferença de crescimento observada entre as espécies de eucalipto foi atribuída ao potencial genético de cada uma delas, e não à inoculação com o fungo ectomicorrízico.



	M1	M5	M6	M10	M12
M1		D1	D2	D3	D4
M5			D5	D6	D7
M6				D8	D9
M10					D10
M12					

FIGURA 3. Crescimento de mudas de *E. "urograndis"* aos 203 dias de idade, inoculadas com 10 culturas dicarióticas de *Pisolithus microcarpus*. O quadro ao lado representa os cruzamentos entre as culturas paternas (M1, M5, M6, M10 e M12).
 D – dicariótico
 C – testemunha (não inoculada)

O peso da matéria seca das raízes das plantas inoculadas apresentou maiores valores em comparação com a testemunha, porém essa diferença não foi significativa (Tabela 2). Resultado similar também foi constatado por Comerlato, 1992, que não observou diferença significativa no peso da matéria seca de raízes das mudas inoculadas com fungos ectomicorrízicos em relação à testemunha. No entanto Rosado et al. (1994a) observaram que mudas de *Pinus* inoculadas com *P. tinctorius* apresentaram um aumento significativo no peso seco das raízes. No presente trabalho, essa não significância com relação ao peso seco de raízes e taxa de colonização pode ser explicada por duas razões: a primeira pode estar relacionada aos maiores coeficientes de variação; 25,12 e 57,09% respectivamente. A segunda pode estar relacionada ao próprio sistema de produção de mudas em tubetes, que são recipientes suspensos e limitam a expansão do sistema radicular além dos seus limites, e, nesse caso, com o passar do tempo, a tendência é que os sistemas radiculares se igualem.

Quanto ao peso seco da parte aérea, observou-se diferença significativa nas mudas inoculadas com os isolados D1, D2, D3, D4, D5, D7, D9 e D10, em relação à testemunha (Tabela 2). As mudas inoculadas com o isolado D4 apresentaram valores significativos, em comparação com a testemunha. O menor valor foi observado em mudas inoculadas com o isolado D8. Observando o isolado D4, verifica-se que a altura de 44,18 cm e o PSPA de 1,68 g são superiores à testemunha em 114 e 73%, respectivamente.

3.2 Porcentagem e conteúdo de nitrogênio e fósforo

As análises de variância para os teores e conteúdo de N e P na parte aérea das mudas não foram conduzidas, pois estas características foram obtidas em duas amostras compostas por tratamento. A inoculação com os dez isolados de fungos ectomicorrízicos propiciou, às mudas, maior absorção de fósforo e

nitrogênio Tanto para porcentagem e conteúdo de P e N, o tratamento testemunha (não inoculado) apresentou os menores valores (Tabela 3). A capacidade do isolado D4 em nutrir as mudas de *Eucalyptus* com N e P foi superior em 54 e 11%, e para o conteúdo total de N e P essas superioridades assumem valores 165 e 91%, respectivamente. As mudas inoculadas com o isolado D8 apresentaram os menores valores (Tabela 3).

É provável que a superioridade, para o crescimento em altura (114%) e peso da matéria seca da parte aérea (73%), promovida pelo isolado D4, seja resultante da eficiência do uso de N e P em mudas inoculadas com esse isolado.

TABELA 2. Percentagem de colonização das raízes de *E. "urograndis"* pelos isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus*, crescimento em diâmetro das mudas obtido no colo (DC), altura total (Alt), peso seco do sistema radicular (PSR) e parte aérea (PSPA) e eficiência micorrízica (EM%) na produção de matéria seca.

Isolados	% mic.	DC (mm)	Alt (cm)	PSR (g)	PSPA (g)	EM %
D1	14,40 a	2,95 c	40,83 cd	0,71 a	1,40 bc	44,3
D2	13,57 a	2,79 bc	41,66 cd	0,84 a	1,54 c	58,8
D3	21,86 a	2,80 bc	40,29 cd	0,77 a	1,54 c	58,8
D4	17,55 a	2,93 c	44,18 d	0,79 a	1,68 c	73,2
D5	12,24 a	2,71 abc	36,47 bc	0,76 a	1,52 c	56,7
D6	23,04 a	2,59 ab	39,54 cd	0,68 a	1,35 abc	39,2
D7	17,59 a	2,78 bc	43,03 cd	0,72 a	1,50 bc	54,6
D8	19,38 a	2,43 a	29,73 ab	0,63 a	1,11 ab	14,4
D9	13,56 a	2,83 bc	40,97 cd	0,86 a	1,70 c	75,3
D10	18,92 a	2,83 bc	37,90 cd	0,71 a	1,48 bc	52,6
Testemunha	-	2,43 a	23,48 a	0,53 a	0,97 a	-

Valores médios seguidos pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste "Fisher's Protected LSD" ($p < 0,05$).



3.3 Eficiência micorrízica

A eficiência micorrízica de *Eucalyptus* “urograndis” na produção de matéria seca da parte aérea foi maior em mudas inoculadas com os isolados D4 e D9 (Tabela 2). As mudas inoculadas com esses isolados também apresentaram conteúdo de fósforo e nitrogênio superior em relação às demais. O conteúdo desses nutrientes foi maior nas plantas inoculadas que nas não inoculadas (Tabela 3). Esse resultado pode ser atribuído aos efeitos da inoculação na eficiência de uso desses elementos pelas mudas de *Eucalyptus* inoculadas com os isolados de *P. microcarpus*, como já foi constatado por Bowen (1973), Malajczuk et al. (1975), Soares (1986, 1993), Vieira & Peres (1988a), e Trajano (1998).

TABELA 3. Percentagem e conteúdo de N e P de mudas de *E. "urograndis"* inoculadas com isolados dicarióticos de *P. microcarpus*, após 203 dias de crescimento.

Isolados	%N	CN(mg.pl ⁻¹)	%P	CP(mg.pl ⁻¹)
D1	2.41	33.62	0.29	3.98
D2	2.78	42.74	0.28	4.23
D3	2.57	39.58	0.30	4.62
D4	2.80	46.89	0.31	5.20
D5	2.44	37.07	0.27	4.11
D6	2.78	37.60	0.29	3.92
D7	2.55	38.12	0.25	3.74
D8	2.56	28.29	0.28	3.09
D9	2.66	45.29	0.24	4.09
D10	1.90	28.03	0.25	3.69
Testemunha	1.82	17.65	0.28	2.72

Conteúdo de P e N (mg / planta) = % P (N) x 10 x peso da muda

3.4 Colonização micorrízica

Após 203 dias de crescimento, em condições de casa de vegetação, todos os 10 isolados híbridos foram capazes de colonizar o sistema radicular, porém não houve diferença significativa entre eles. As raízes das plantas não inoculadas não apresentaram colonização micorrízica (Tabela 2). Observou-se uma tendência de maior micorrização nas raízes inoculadas com o isolado D6 (Tabela 2). O isolado D5 apresentou menor capacidade de colonização. A percentagem de micorrizas nas raízes foi relativamente baixa em todos os tratamentos, em comparação com outros trabalhos. É provável que o teor de fósforo presente no substrato (9,6 ppm de P extraível) usado tenha afetado a micorrização. Vários pesquisadores têm sugerido que o teor de fósforo na planta é um dos principais fatores que controlam a infecção micorrízica (Sanders, 1975; Menge et al., 1978). No entanto, Ratnayake et al. (1978) e Graham et al. (1981) sugeriram que a baixa disponibilidade de fósforo no solo e o baixo conteúdo de fósforo na planta correlacionaram com o decréscimo do nível de fosfolipídios e com o aumento da permeabilidade da membrana celular da raízes, favorecendo a micorrização.

Soares (1986) demonstrou que os teores de P e N usados na formação das mudas de eucalipto, no viveiro, são altos e inibem a infecção dos fungos.

Vieira & Peres (1988a) observaram que a maior percentagem de ectomicorriza foi de 79% no solo que continha 3,5 ppm de P disponível. Os mesmos autores concluíram que a máxima eficiência simbiótica do fungo foi verificada no nível de 23 ppm de P aplicado (1,71 ppm de P extraível), e a infecção do fungo foi inibida significativamente acima de 94 ppm de P aplicado (11,1 ppm de P extraível). Nesse mesmo ano, Vieira & Peres (1988b) concluíram, em um outro trabalho, que a eficiência simbiótica entre as mudas de

Eucalyptus grandis e o fungo *Pisolithus tinctorius* somente se verificou no nível baixo de fósforo.

Soares (1993) sugeriu que o mecanismo mais provável de regulação da simbiose micorrízica seria o relacionamento entre o fósforo e os carboidratos da planta, já que o teor de fósforo influencia o metabolismo, a partição e o transporte de carboidratos. Trajano (1998) sugeriu que a micorrização é afetada indiretamente pelo fósforo no solo e diretamente pelo fósforo da planta, pois uma vez que se aumenta a disponibilidade de fósforo no solo, haverá um maior fluxo deste nutriente para a planta e, desse modo, passando a atuar no processo de micorrização. Evento que provavelmente tenha ocorrido no presente estudo.

Esses resultados revelam a existência de variações importantes entre os isolados e a possibilidade de condução de estudos de seleções para a constituição de inóculos potencias para promover o crescimento e a absorção de nutrientes para as mudas. Entretanto, a eficácia dessa seleção depende do reconhecimento do mecanismo da herança, principalmente se esta é do tipo aditivo ou não aditivo, uma vez que, no primeiro caso, há um efeito significativo da Capacidade Geral de Cruzamento (CGC) e, no segundo, a significância dos efeitos ocorre em conformidade com a Capacidade Específica de Cruzamento (CEC), relacionada a cada genitor envolvido no cruzamento. O crescimento em diâmetro, altura e a taxa de colonização das raízes apresentam significância dos efeitos de CGC e ausência dos de CEC. Isso revela que, para essas características, as capacidades gerais de cruzamento dos genitores monocarióticos são diferenciadas e devem ser consideradas na seleção de genitores monocarióticos (Tabela 4).

TABELA 4. Resumo das análises dialélicas para as características de diâmetro das mudas obtido no colo (DC), altura total das mudas (Alt), peso seco do sistema radicular (PSR) e da parte aérea (PSPA) e taxa de colonização (%mic).

Fonte de variação	GL	Quadrados médios (QM)							QM	
		DC	EM%	Alt	PSR	PSPA	GL	% mic		
Dicarióticos	9	0,0968*	1020,49	67,01*	0,0203 ^{ns}	0,1146 ^{ns}	9	136,31 ^{ns}		
CGC	4	0,1744**	1358,74	114,71*	0,02900 ^{ns}	0,11565 ^{ns}	4	261,70**		
CEC	5	0,03474 ^{ns}	749,89	28,85 ^{ns}	0,0133 ^{ns}	0,0810 ^{ns}	5	36,00 ^{ns}		
Resíduo	30	0,0438	849,94	28,27	0,0354	0,0734	90	96,66		
Média	-	2,764	-	39,46	0,747	1,482	-	17,21		
CV(%)	-	7,57	-	13,47	25,12	18,28	-	57,09		

ns, *, **. Referem-se, respectivamente, aos efeitos (dicarióticos, CGC e CEC) não significativos e significativos pelo teste de F, aos níveis de 1 e 5% de probabilidade

Os dados das Tabelas 5 e 6 mostram que, tanto para o diâmetro quanto para a altura, os genitores M1 e M12 foram aqueles que apresentaram os maiores valores de CGC, indicando a opção de seleção do isolado dicariótico 4, pois ele reúne ambos genitores no mesmo organismo dicariótico, que é capaz de colonizar as raízes e gerar efeitos benéficos para o crescimento. Esses valores positivos de CGC indicam que esses genitores geram progênies com valores médios acima da média da população, resultando, assim, em ganho genético potencial.

Quanto à eficiência micorrízica, os genitores M1 e M12 também apresentam os maiores valores de CGC, sugerindo que pode-se selecionar o isolado dicariótico 4, pois esse gera efeitos positivos em relação a esse parâmetro (Tabela 7).

TABELA 5. Matriz de médias e efeitos da Capacidade de Combinação Geral (CCG) e Específica (CCE) do diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus* "urograndis", envolvendo os genitores monocarióticos respectivas descendências dicarióticas híbridas de *Pisolithus microcarpus*.

		Isolados monocarióticos paternos (M)					
	M1 (0,138)*	M5(-0,009)	M6(-0,098)	M110(-0,135)	M12(0,105)		
M1		2,95(0,567)**	2,79(-0,013)	2,80(0,033)	2,93 (-0,077)		
M5			2,71(0,053)	2,59(-0,030)	2,78(-0,080)		
M6	Cruzamentos recíprocos			2,43(-0,100)	2,83(0,06)		
M10	não realizados				2,83(0,097)		
M12							
					Média da testemunha (não-inoculada)		
					2,43		

()* - Valores das CCG's das culturas monocarióticas paternas

()** Valores das CEC's das culturas dicarióticas híbridas

TABELA 6. Matriz de médias e efeitos da Capacidade de Combinação Geral (CCG) e Específica (CCE) da altura de mudas de *Eucalyptus* "urograndis", envolvendo os genitores monocarióticos e respectivas descendências dicarióticas híbridas de *P. microcarpus*.

	Isolados monocarióticos paternos (M)				
	M1 (3,040)*	M5(0,677)	M6(-3,003)	M110(-3,46)	M12(2,747)
M1		40,8 (-2,35)**	41,7(2,16)	40,3(1,25)	44,2(-1,07)
M5			36,5(-0,66)	39,5(2,86)	43,0(0,15)
M6	Cruzamentos recíprocos			29,7(-3,27)	41,0 (1,77)
M10	não realizados				37,9 (-0,85)
M12					
	Média da testemunha (não-inoculada)				23,5

()* - Valores das CGC's das culturas monocarióticas paternas

()** - Valores das CEC's das culturas dicarióticas híbridas

TABELA 7. Matriz de médias e efeitos da Capacidade de Combinação Geral (CCG) e Específica (CCE) da eficiência micorrízica em mudas de *Eucalyptus* "urograndis", envolvendo os genitores monocarióticos e respectivas descendências dicarióticas híbridas de *Pisolithus microcarpus*.

	Isolados monocarióticos paternos (M)				
	M1(7,98)*	M5(-6,23)	M6(1,02)	M10(-14,53)	M12(11,74)
M1		41,28 (-9,83)**	59,39 (1,01)	55,24 (12,43)	65,47 (-3,61)
M5			52,98 (8,82)	36,04 (7,45)	48,42 (-6,44)
M6	Cruzamentos recíprocos não realizados			15,95 (-19,89)	72,18 (10,05)
M10					46,58 (0,015)
M12					
Média da testemunha (não-inoculada)					2,43

()* - Valores das CGC's das culturas monocarióticas paternas

()** Valores das CEC's das culturas dicarióticas híbridas

Para as variáveis, diâmetro e altura, observa-se a superioridade de M1 e M12 com relação aos outros genitores monocarióticos e com relação ao tratamento testemunha (não inoculado)(Figura 4).

Nessas condições, os esporos provenientes das frutificações desse isolado D4 (M1 x M12) podem ser empregados na composição de inóculos para uso em larga escala em viveiros de mudas de *Eucalyptus*.

O uso de esporos como agente de inoculação apresenta uma série de vantagens sobre os métodos que utilizam estruturas fúngicas assexuais, pois eles são facilmente armazenados por maiores períodos de tempo (Marx, 1976) e oferecem vantagens econômicas na produção comercial (Cordell et al., 1987). A implementação do uso de esporos, até então, não era possível ou era de uso empírico, devido à falta de estudos sobre a herança das características de efetividade simbiótica. Uma alternativa viável seria estimular a formação de basidiocarpo em mudas de eucalipto inoculadas com *Pisolithus*, obtendo-se, assim, uma grande quantidade de esporos.

Considerando a taxa de colonização radicular decorrente do efeito de cada genitor monocariótico cruzado para a geração das 10 estirpes híbridas, observa-se que o isolado monocariótico 10 propiciou uma taxa de colonização média de 20,8% (Figura 5), porém, sem resultar em benefícios para o crescimento e absorção de N e P (Figura 4 e 6).

As análises dialélicas para os teores e conteúdos de N e P não foram realizadas em decorrência da ausência de um dispositivo experimental apropriado.

Quanto à absorção desses nutrientes, considerando os isolados monocarióticos, observa-se que o M1 apresentou valores maiores (Figura 6), sugerindo que o cruzamento desse, com qualquer outro isolado monocariótico, poderá gerar ganhos em termos nutricionais.

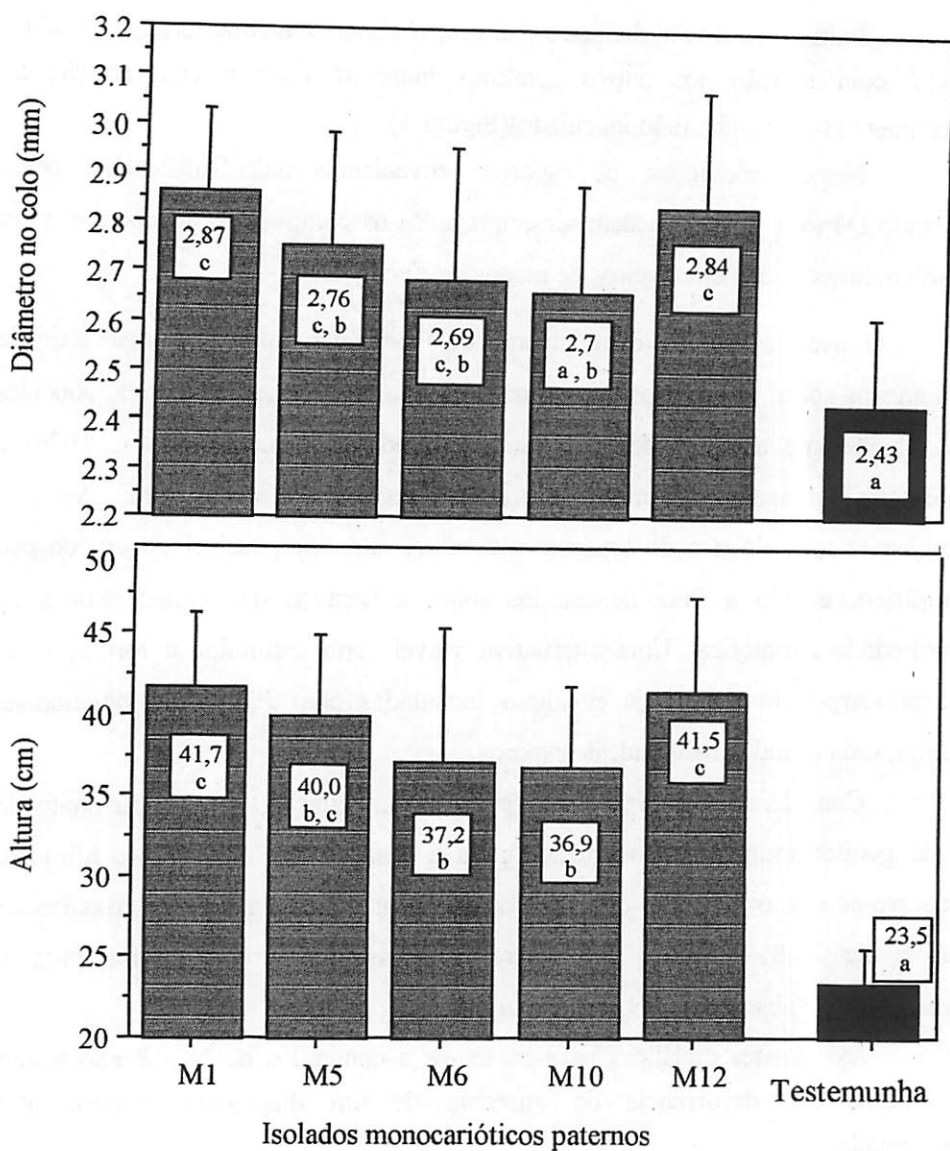


FIGURA 4. Crescimento em diâmetro em altura de mudas de *Eucalyptus urograndis*, associados aos cinco isolados monocarióticos de *P. microcarpus* utilizados como progenitores e à testemunha (não inoculada). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste "Fischer's Protected LSD".

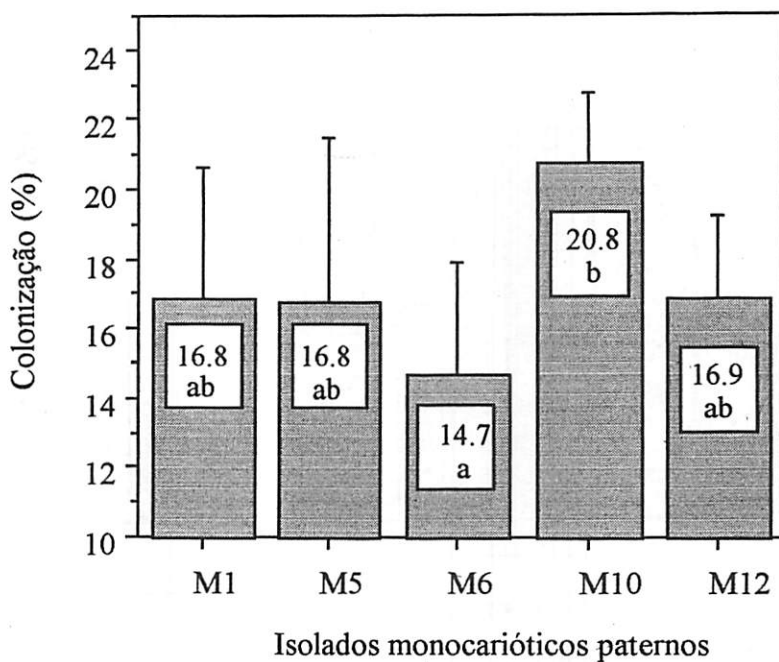


FIGURA 5. Taxa de colonização micorrízica de cinco isolados monocarióticos de *Pisolithus microcarpus* utilizados como progenitores. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste “Fischer’s Protected LSD”.

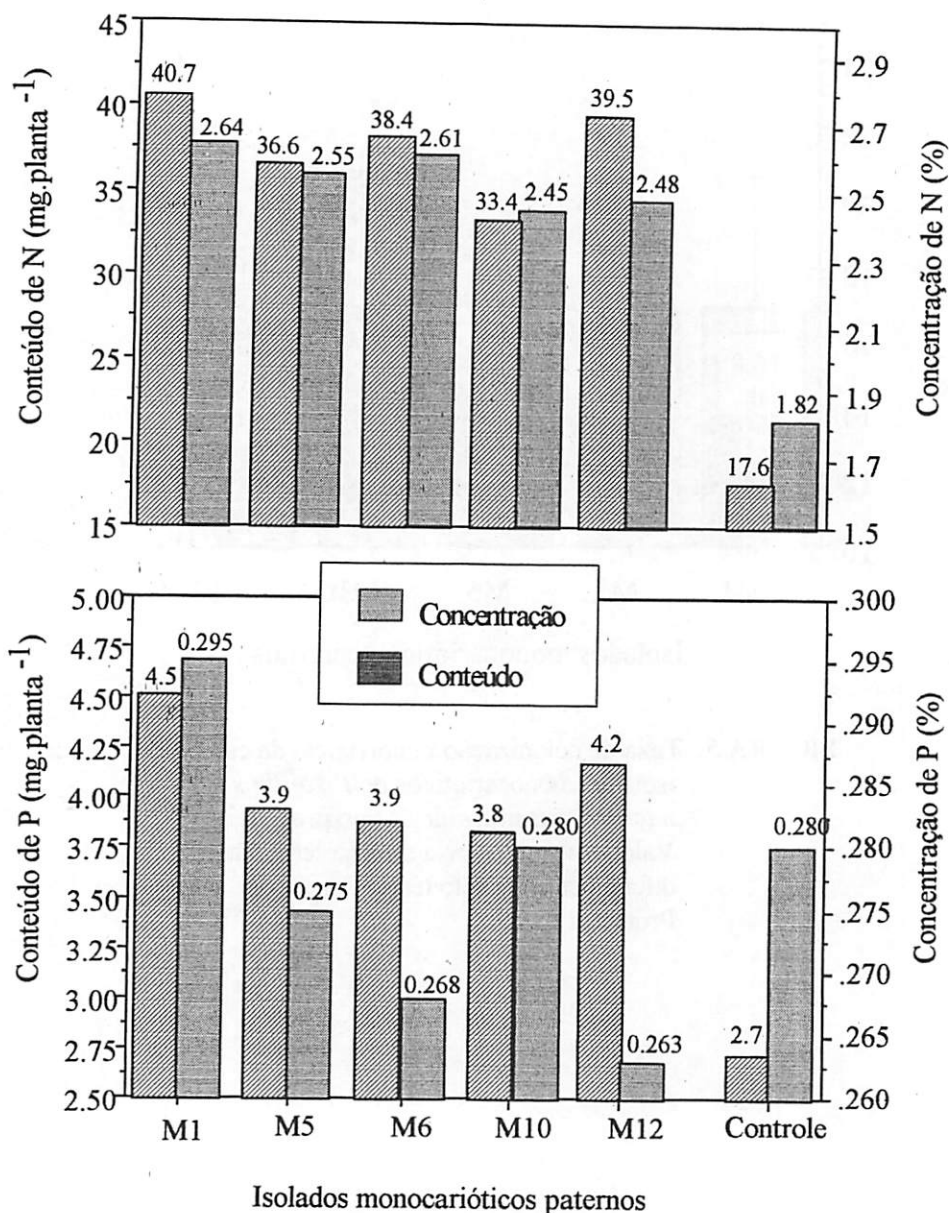


FIGURA 6. Concentração e conteúdo de nitrogênio e fósforo na parte aérea de mudas de *Eucalyptus* "urograndis", associados aos cinco isolados monocarióticos de *P. microcarpus* utilizados como progenitores e a testemunha (não inoculada).

4 CONCLUSÕES

1. É possível obter isolados fúngicos híbridos de *Pisolithus* por meio de cruzamentos controlados entre isolados genitores monocarióticos compatíveis.
2. Os efeitos desses isolados sobre a planta hospedeira são variáveis de acordo com os isolados monocarióticos empregados como genitores.
3. As diferenças na Capacidade Geral de Cruzamento (CGC) entre esses isolados foram significativas, enquanto que as diferenças na Capacidade Específica de Cruzamento (CEC) não o foi.
4. O uso de esporos de frutificações de isolados, cujos genitores apresentam altos valores de CGC, é viável para gerar ganhos genéticos nos benefícios da simbiose, em termos de promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus* e na capacidade de melhoria do estado nutricional.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWEN, G. D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: MARKS, G. C.; KOSLOWSKI, T. T. (Ed.). *Ectomycorrhizae their ecology and physiology*. New York: Academic Press, 1973. p. 151-205.
- CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, A. F. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para o fungo ectomicorrizico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch. *Cerne*, Lavras, v. 3, n. 1, p. 143-160, 1997.
- COMERLATO, A. G. Especificidade e eficiência de fungos ectomicorrizicos para *Eucalyptus*. 1992. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- CORDELL, C. E.; MARX, D. H.; MAUL S. B.; OWEN, J. H. Production and utilization of ectomycorrhizal fungal inoculum in eastern United States. In: SYLVIA, D. M.; HUNG, L. L.; GRAHAM, J. H. (Ed.). *Mycorrhizae in next decade: practical applications and research priorities*. Gainesville, 1987. p. 287-289. (NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7., 1987, Gainesville, FL. *Proceedings...* Gainesville, FL, 1987)
- CRUZ, C. D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997.
- DIXON, R. K.; GARRET, H. E.; STELZER, H. E. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine progenies inoculated with three isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Silvae Genetic*, Frankfurt, v. 36, n. 5/6, p. 240-245, 1987.
- GARBAYE, J.; DELWAULLE, J. C.; DIANGANA, D. Growth response of Eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management*. Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 151-57, June 1988.
- GIOVANETTI, M. G.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980
- GRAHAN, J. M.; LEONARD, R. T.; MENGE, J. A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizae formation. *Plant Physiology*, Rockville, v. 68, n. 3, p. 548-552, Sept. 1981.

HETRICK, B. A. D. Acquisition of phosphorus by VA mycorrhizal fungi and the growth responses of their host plants. In: BODDY, L.; MARCHANT, R.; READ, D. J. (Ed.). **Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 205-226.

KOPE, H. H.; TSANTRIZOS, Y. S.; FORTIN, J. A.; OGILVIE, K. K. *p*-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-*p*-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus* **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 4, p. 258-264, Apr. 1991.

LAMHAMEDI, M. S.; BERNIER, P. Y.; FORTIN, J. A. Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. **Tree Physiology**, Victoria, v. 10, n. 2, p. 153-167, Mar. 1992.

MANJUNATH, A.; HABTE, M. Root morphological characteristics of host species having distinct mycorrhizal dependency. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 3, p. 671-767, Mar. 1991.

MALAJCZUK, N.; McCOMB, A. J.; LONERAGAN, J. F. Phosphorus uptake and growth of micorrhizal and uninfected seedlings of *Eucalyptus calophylla*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 23, n. 2, p. 231-238, 1975.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St Paul, v. 59, n. 2, p. 153-163, Feb. 1969.

MARX, D. H. Synthesis of ectomycorrhizae on loblolly pine seedling with basidiospores of *Pisolithus tinctorius*. **Forest Science**, Wshington, v. 22, n. 1, p. 13-20, Mar. 1976.

MENGE, J. A.; STERILE, D.; BAGYARAJ, D. J.; JOHNSON, E. L. V.; LEONARD, R. T. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 80, n. 3, p. 575-578, 1978.

RATNAYAKE, M.; LEONARD, R. T.; MENGE, J. A. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 81, n. 3, p. 543-552, 1978.

ROSADO, S. C. S.; KROPP, B. R.; PICHÉ, Y. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. II. Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal traits. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 111-117, JAn.1994a.

ROSADO, S. C. S., KROPP, B. R.; PICHÉ, Y. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis: I. Host plant variability and heritability of ectomycorrhizal and root traits. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 105-110, Jan. 1994b.

SALES, N. Modelo para estudo da diversidade genética em populações naturais de *Pisolithus spp.* 2001. 95 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALES, N.; ROSADO, S. C. S.; CARVALHO, D.; SOUZA, A. M. Simbiose *Eucalyptus - Pisolithus*: desenvolvimento de uma nova estratégia de melhoramento genético para a resistência aos estresses ambientais. In: SIMPÓSIO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 4., 2000, Blumenau. Anais... Blumenau, 2000. 9 p.

SANDERS, F. E. The effect of foliar-applied phosphate on the mycorrhizal infection of anion roots. In: SANDERS, F. E.; MOSSE, B.; TINKER, P. B. (Ed.). *Ectomycorrhizas*. London: Academic Press, 1975. p. 261-276.

SOARES, I. Eficiência de utilização de frações de fósforo e partição de carboidratos em eucalipto com ectomicorrizas. 1993. 127 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. MG.

SOARES, I. Níveis de fósforo no desenvolvimento de micorrizas por *Pisolithus tinctorius* (Pers) Cocker & Couch e no crescimento de mudas de eucalipto. 1986. 51 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TRAJANO, M. A. B. Suprimento de P de eucalipto com raízes subdivididas e formação de micorrizas. 1998. 43 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VIEIRA, R. F.; PERES, J. R. R. Definição do teor de fósforo no solo para a máxima eficiência da associação ectomicorrizica em *Eucalyptus grandis*. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, Campinas, v. 12, n. 3, p. 237-41, set./dez. 1988a.

VIEIRA, R. F.; PERES, J. R. R. Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Campinas, v.12, n. 3, p. 231-35, set./dez. 1988 b.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. *Applied forest tree improvement*. New York: John Willey, 1984. 505 p.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CULTURAS E EXTRATOS DO FUNGO *Pisolithus microcarpus* E INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE PATÓGENOS RADICULARES

RESUMO

ABREU, Maria Floriana Esteves. **Atividade antifúngica de culturas e extratos do fungo *Pisolithus microcarpus* e inibição de crescimento de patógenos radiculares.** 2002. Cap. 3, p. 63 - 85. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

No presente trabalho, objetivou-se detectar substâncias antifúngicas em extratos de dez isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus*, resultantes do cruzamento de culturas monocarióticas obtidas a partir de esporos de basidiocarpos coletados em povoamentos de *Eucalyptus* sp, da região de Camargos- MG. Os extratos dos isolados ectomicorrízicos foram aplicados em placas de sílica(CCD- cromatografia em camada delgada) e, após a corrida, as bandas formadas pelas substâncias foram observadas sob luz UV (365 e 254 nm). Quando os cromatogramas foram pulverizados com suspensão de esporos de *Cladosporium herbarium* (5×10^5 esporos/ml), conclui-se que os metabólitos sintetizados por todos os isolados inibiram o crescimento do fungo. Outros ensaios foram conduzidos, objetivando avaliar o efeito dos extratos no crescimento de *Fusarium oxysporum*, e constatou-se ausência de antagonismo nos compostos. Em placas de Petri, fez-se o pareamento de culturas dos isolados ectomicorrízicos com cultura de *Rhizoctonia solani*. Empregaram-se 3 repetições por tratamento e uma testemunha sem o fungo ectomicorrízico. Observou-se, em todos os isolados de *Pisolithus microcarpus*, o efeito inibitório ao crescimento do patógeno. Extratos aquosos de três isolados dicarióticos (D4, D6 e D7), selecionados ao acaso, foram submetidos a placas de CCD. Aplicaram-se ácido oxálico e ácido clorogênico, a fim de detectar a presença desses compostos nos extratos ectomicorrízicos. Comparando o Rf (fator de retenção), concluiu-se que os extratos, provavelmente, não apresentam em sua composição, os ácidos usados como padrão. No entanto, todos os extratos foram tóxicos a *Cladosporium herbarum*. Os resultados desse estudo demonstraram que metabólitos tóxicos foram produzidos pelos isolados de *Pisolithus microcarpus*, e foram ativos contra os fungos *C. Herbarium* e *Rhizoctonia solani*.

*Comitê Orientador: Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA (Orientador); Prof^a Dulcinéia de Carvalho – UFLA; Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA; Prof^a Maria das Graças Cardoso – UFLA.

ABSTRACT

ABREU, Maria Floriana Esteves. Antifungal activity of cultures and extracts of *Pisolithus microcarpus* and inhibition of the growth of root pathogens. 2002. Cha. 3, p. 63 - 85 Thesis (Doctorate in Phytopatology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

This work aimed to detect antifungal substances in the extract of ten dicarriotic isolates of *Pisolithus microcarpus*, which resulted from crossbreeding of monocarriotic cultures obtained from the basiocarp spores collected in populations of *Eucalyptus* sp. from Camargos – MG region. The extracts were applied in silica plates (TLC – thin layer chromatography), and after the run of the substances through the plate, bands formed were observed under UV light (365 and 254 nm). When the chromatograms were pulverized with a suspension of *Cladosporium herbarium* spores (5×10^5 spores/ml) it was concluded that the metabolites synthesized by all isolates inhibited the growth of the fungi under test. Other assays were carried on, in order to evaluate the effect of the extracts on the growth of *Fusarium oxysporum*. In just case no antagonism activity was verified. The matching of the ectomycorrhizae culture isolates with *Rhizoctonia solani* culture was done in Petri dishes. Three replications were done for each treatment and a control without ectomycorrhizal fungi. In all *Pisolithus microcarpus* isolates the pathogenetic growth inhibition effect was observed. Aqueous extracts of dicarriotic samples selected by chance (D4, D6 and D7) were submitted to TCL plates. Oxalic acid and chlorogenic acid were applied in order to detect the presence of these compounds in the ectomycorrhizae extracts. Comparing the Rf (retention factor) allowed concluding that the extracts probably didn't present in their composition, the acids taken as patterns. Nevertheless, all extracts were fungitoxic to *C. herbarium*. The results of this study demonstrate that metabolites were produced by the isolates of *Pisolithus microcarpus* and were toxic to *C. herbarum* and the pathogenic fungus *R. solani*.

Advising Committee: Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA (Major Professor); Prof^ª Dulcinéia de Carvalho – UFLA; Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA; Prof^ª Maria das Graças Cardoso – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

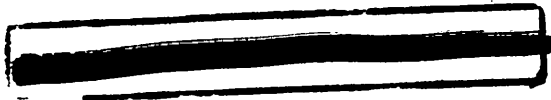
Patógenos de solo são responsáveis por tombamentos de mudas (damping-off) em viveiros florestais em muitos países. Os fungos mais comumente isolados dessas mudas são *Rhizoctonia*, *Pythium* e algumas espécies de *Fusarium* (Salerno et al., 2000). Na América do Norte, espécies de *Fusarium* são responsáveis por damping-off em viveiros de coníferas, causando grandes perdas (Chakravarty et al., 1999). Normalmente, essas doenças são controladas através do uso de vários fungicidas. No entanto, esses têm sido pouco efetivos devido ao desenvolvimento de resistência dos patógenos (Chakravarty et al., 1999).

Diversos trabalhos têm sugerido o uso de fungos ectomicorrízicos por esses melhorarem o estado nutricional das plantas e no controle de doenças radiculares.

As ectomicorrizas são comuns associações simbióticas entre raízes e fungo. Essas associações e fungos, que afetam o sistema radicular têm uma importante semelhança. Ambos são tipos de parasitismo, que competem pela colonização dos mesmos tipos de raízes, Marx (1973b).

Os fungos ectomicorrízicos têm sido sugeridos como responsáveis pelo aumento da resistência de seus hospedeiros a patógenos, por formarem uma barreira física conferida pelo manto fúngico, utilizando excesso de carboidratos nas raízes das plantas, reduzindo a atratividade química das raízes a patógenos, permitindo o crescimento de antagonistas da rizosfera e pela produção de compostos antimicrobianos (Zak, 1964). Porém, os mecanismos que envolvem a supressão da doença pela ectomicorriza são pouco conhecidos.

A síntese *in vitro* de compostos antifúngicos tem sido sugerida em mais de 90 espécies de fungos ectomicorrízicos (Marx, 1973a). Entretanto, poucos



estudos têm sido feitos para verificar o papel da antibiose pela ectomicorriza *in vivo*. Duchesne et al. (1988) sugeriram que a presença de compostos antifúngicos produzidos pelo fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* está associada com o aumento significativo da resistência de mudas de *Pinus resinosa* à infecção pelo patógeno *Fusarium oxysporum*. O conhecimento da biosíntese de antibióticos poderia ser essencial se o fungo ectomicorrízico ou os compostos sintetizados por ele fossem usados como pesticidas contra patógenos radiculares (Duchesne et al., 1989).

Vários compostos com atividade antimicrobiana têm sido isolados de fungos ectomicorrízicos: diatretine de *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina* Peck (Marx, 1969b), micorrizina A e cloromicorrizina A, de um fungo ectomicorrízico, isolados de raízes de *Monotropa hipopitys* L. (Trofast & Wickberg, 1977), ácido oxálico de *Paxillus involutus* Fr. (Duchesne et al., 1989), ácido p-hidroxibenzofórmico e ácido p-hidroximandélico de *P. tinctorius* (Kope et al., 1991; Tsantrizos et al., 1991). A complexidade da estrutura dessas substâncias são típicas de metabólitos secundários produzidos por fungos (Kope et al., 1991).

Baptista et al. (1999) observaram a produção *in vitro* de compostos fenólicos durante a interação de raízes de *Eucalyptus urophylla* com o isolado 185 de *Pisolithus tinctorius* e sugeriram que o acúmulo de compostos fenólicos na planta hospedeira parece ter papel importante na compatibilidade ectomicorrízica. Fenóis antibióticos podem ser formados em resposta ao ingresso de patógenos e fazem parte dos mecanismos de resposta ativa, ou, por outro lado, ocorrer constitutivamente nas plantas e funcionar como inibidores pré-formados associados à resistência de plantas não hospedeiras (defesa constitutiva ou pré-formada) (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

No Brasil existem poucos estudos com relação a substâncias antifúngicas sintetizadas por fungos ectomicorrízicos, sendo assim, objetivou-se

com este trabalho detectar substâncias antifúngicas produzidas por 10 isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus* e verificar o efeito desses compostos em patógenos do sistema radicular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de fungos ectomicorrízicos

2.1.1 Preparo do inóculo do fungo ectomicorrízico

Em placas de Petri contendo meio Melin Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969a) (Tabela 6 A), foram colocados discos de papel celofane previamente fervidos em EDTA por 10 minutos e, em seguida, lavados em água deionizada e após, esterilizados por 20 minutos a 120 °C. Dois discos (10 mm de diâmetro) de colônias dos isolados dicarióticos do fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* com 30 dias de idade e crescidos no mesmo meio de cultura foram colocados em cada placa.

2.1.2 Obtenção do extrato dos fungos ectomicorrízicos

Segundo uma modificação da técnica descrita por Kasuya (1996), os micélios foram retirados das placas após 34 dias e colocados em Becker contendo 100 mL de metanol. Essa mistura foi estocada por 24 horas e filtrada posteriormente, e o metanol (MeOH) evaporado a vácuo a 40 °C. O extrato foi armazenado no escuro sob refrigeração a 10 °C.

2.1.3 Obtenção da cultura do fungo *Cladosporium herbarum*

Discos de colônias do fungo *C. Herbarum* (isolado de maracujá, cedido pelo professor Mario Lúcio), com 20 dias de idade, crescidos em meio BDA (batata, dextrose e ágar) foram repicados para placas de Petri contendo o mesmo meio e levados para incubadora (BOD) a 25 °C por 10 dias. Obtendo-se assim esporos de *C. herbarum*.

2.1.4 Cromatografia em camada delgada

Os extratos dos isolados dicarióticos do fungo *P. microcarpus* foram submetidos à CCD (cromatografia em camada delgada), usando placas de sílica gel 60 F254 e, após a aplicação dos extratos ectomicorrízicos, fez-se a corrida com os solventes clorofórmio e metanol (10:1). Observaram-se as bandas sob luz UV, com comprimento de onda de 365 nm e 254 nm. Após, pulverizaram-se as placas com suspensão de esporos de *C. herbarum* (5×10^5 esporos / mL de meio de sacarose, seguindo-se incubação em câmara de crescimento a 28 °C por 3 dias, a fim de verificar a presença de substâncias fungitóxicas, evidenciadas pelo halo de inibição do crescimento do fungo teste. A distância relativa (rRf) de cada halo de inibição foi calculada como a distância relativa entre a distância do halo de inibição da linha inicial e a distância do halo fluorescente apresentado pelo extrato do fungo ectomicorrízico.

2.2 Efeito de extratos ectomicorrízicos na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Pythium* sp.

Foi testado o efeito dos extratos dos isolados dos fungos ectomicorrízicos sobre os patógenos *R. Solani* (isolado de batata) e *Pythium* sp

(isolado do laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA).

Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, colocaram-se 20 mL de meio BDA. Em seguida, colocou-se de um lado da placa um disco de papel de filtro contendo o extrato do fungo micorrízico, e todas as placas foram colocadas sob refrigeração a 10 °C por 60 minutos. Decorrido esse tempo, colocou-se do outro lado da placa 1 disco de micélio de 10 mm de diâmetro de bordas de colônias de *R. Solani* ou *Pythium* sp com 10 dias de idade. Em seguida, as placas foram colocadas em incubadora a 25 °C. Após 24 horas, fez-se a primeira avaliação quanto à formação do halo de inibição do crescimento dos fungos patogênicos e, decorridos 4 dias, fez-se outra avaliação.

2.2.1 Delineamento experimental

Nesse experimento foram utilizados extratos de 10 isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus*, (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10), testemunha, 2 fungos patogênicos, *Pythium* sp e *R. solani*, num total de 13 tratamentos, com 3 repetições (3 placas por tratamento) em delineamento inteiramente casualizado.

2.2.2 Avaliação e condução do experimento

O tempo de incubação foi definido de acordo com a formação ou não do halo de inibição do crescimento do fungo patogênico.

2.3 Pareamento de 10 isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus* com cultura de *R. solani*

Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, colocaram-se 20 mL de meio MNM. De um lado da placa, colocou-se 1 disco de micélio (10 mm) de cultura do fungo ectomicorrízico com 15 dias de idade e, em seguida, essas foram levadas para incubadora a 25°C durante 8 dias. Decorrido esse tempo, colocou-se, do outro lado da placa, 1 disco de micélio (10 mm) de colônia de *R. Solani*, e as placas foram levadas novamente para incubadora. Após 4 dias, avaliou-se a formação do halo de inibição do crescimento do fungo patogênico e calculou-se o raio de inibição (rRf), como sendo raio de inibição/ raio do disco do fungo ectomicorrízico

2.4 Inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* por extratos de fungos ectomicorrízicos

2.4.1 Obtenção do fungo patogênico

Discos de colônias do fungo *Fusarium oxysporum* (fungo isolado de café, cedido pelo laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA), com 20 dias de idade, crescidos em meio BDA, foram repicados para placas de Petri contendo o mesmo meio, obtendo-se assim cultura do patógeno.

2.4.2 Obtenção do extrato do fungo ectomicorrízico

Nesse teste foi utilizado o mesmo extrato citado no item 2.1.2.

2.4.3 Condução do experimento

Em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, colocaram-se 0,5 mL de extrato ectomicorrízico. Após, colocaram-se 20 mL de meio BDA. Em seguida, as placas foram acondicionadas sob refrigeração por 16 horas. Após esse período, no centro de cada placa, foi colocado um disco de meio (10 mm de diâmetro) contendo micélio de cultura de *Fusarium oxysporum* com 28 dias de idade. Após, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25 °C por 4 dias.

2.5 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de 3 isolados ectomicorrízicos, usando como padrão o ácido oxálico e ácido clorogênico

Nesse ensaio, selecionaram-se, ao acaso, três isolados (D4, D6 e D7) e procedeu-se à extração, segundo a metodologia de Kasuya 1996, modificada.

Em erlenmeyer com capacidade para 250 mL, colocaram-se 200 mL de meio líquido (MNM, Marx, 1969a) e 6 discos de micélio de bordas de cultura dos isolados ectomicorrízicos de 15 dias de idade. Após 30 dias, em erlenmeyer com capacidade para 500 mL, colocaram-se 300 mL de meio líquido onde os fungos cresceram, e 20 g de micélio de cada cultura, e acrescentaram 300 mL de metanol. Após 24 horas, filtrou-se a mistura e o metanol foi evaporado a vácuo em evaporador rotativo a 60 °C. Esses extratos foram estocados no escuro a -5 °C de um dia para o outro. Fez-se, em seguida, o fracionamento, separando-se a parte líquida com 90 mL de acetato de etila em 3 alíquotas de 30 mL. Após a separação, acrescentaram-se 1,08 g de sulfato de magnésio (Mg SO₄

anidro), para absorver o resto da água do extrato. Após 24 horas, filtrou-se o extrato e evaporou-se o acetato de etila com o mesmo procedimento do metanol. Em seguida, a substância foi levada para estufa a 35 °C para completa evaporação do acetato. A substância foi dissolvida em 2 mL de metanol. Em seguida, procedeu-se à aplicação dos extratos em placas de sílica (CCD).

Na tentativa de identificar as substâncias presentes nos extratos, usaram-se, como padrão, ácido oxálico e ácido clorogênico na concentração de 0,18 g de ácido/ 5 ml de metanol. Após a secagem da placa, essas foram pulverizadas com suspensão de esporos de *C. herbarum* (5×10^5 esporos / mL de meio de sacarose), seguindo-se incubação em câmara de crescimento a 28 °C por 3 dias, a fim de verificar a presença de substâncias fungitóxicas, evidenciadas pelo halo de inibição do crescimento do fungo teste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de fungos ectomicorrízicos

Algumas substâncias foram detectadas nos extratos dos isolados dos fungos ectomicorrízicos. Todas foram visíveis sob luz UV 365 nm e 254 nm, mas nem todas foram tóxicas ao fungo teste *C. herbarum*. (Figuras 1). É provável que algumas substâncias presentes nos extratos dos isolados D1, D2, D3, D4, D6 D9 D10 sejam do mesmo grupo químico, uma vez que os valores de Rf são os mesmos (Tabela 1).

Os fungos ectomicorrízicos são capazes de produzir substâncias, mesmo na ausência da planta hospedeira, como foi observado no presente trabalho. Kasuya et al. (1996) observaram a presença de compostos em extratos de fungos ectomicorrízicos tanto na presença ou ausência da planta hospedeira.

Baptista et al. (1999) observaram a produção de compostos fenólicos durante a infecção das raízes de *E. urophylla* por dois isolados de *P. tinctorius in vitro*. Muitos trabalhos têm sugerido a produção de metabólitos, que protegem as raízes contra patógenos radiculares (Marx, 1969a e 1969b; Marx & Davey, 1969; Sylvia & Sinclair, 1983a e 1983b; Kope & Fortin, 1990; Kope et al., 1991; Suh et al., 1991)). Em alguns trabalhos, os autores identificaram esses metabólitos (Marx & Davey, 1969; Duchesne et al., 1989; Kope et al., 1991).

TABELA 1. Halo de inibição do crescimento de *C. herbarum* em extratos equivalentes a 3,7 g de micélio fresco de isolados de *Pisolithus microcarpus*, aplicados em placas de CCD.

Extratos		* rRf	
D1	0,98	1,00	1,08
D2	1,00	1,01	1,0
D3	0,95		
D4	1,00	1,12	
D5	1,10		
D6	1,00	1,00	1,00
D7	1,08		
D8	0,94	1,00	1,05
D9	0,95	0,99	
D10	0,90		

*Rrf – distância relativa do halo de inibição / distância do halo fluorescente formado pela substância.

3.2 Efeito de extratos ectomicorrízicos na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Pythium* sp

Os extratos dos isolados não afetaram o crescimento dos patógenos *R. solani* e *Pythium* sp. Resultado semelhante foi observado por Kasuya et al. (1996), que não detectaram efeito dos extratos micorrízicos no crescimento de *R. solani*.

Perrin & Garbaye (1983) sugeriram que a difusibilidade da substância produzida pelo fungo ectomicorrízico *Hebeloma crustuliniforme* inibiu o crescimento de *Pythium ultimum*. Fato esse, que não ocorreu no presente

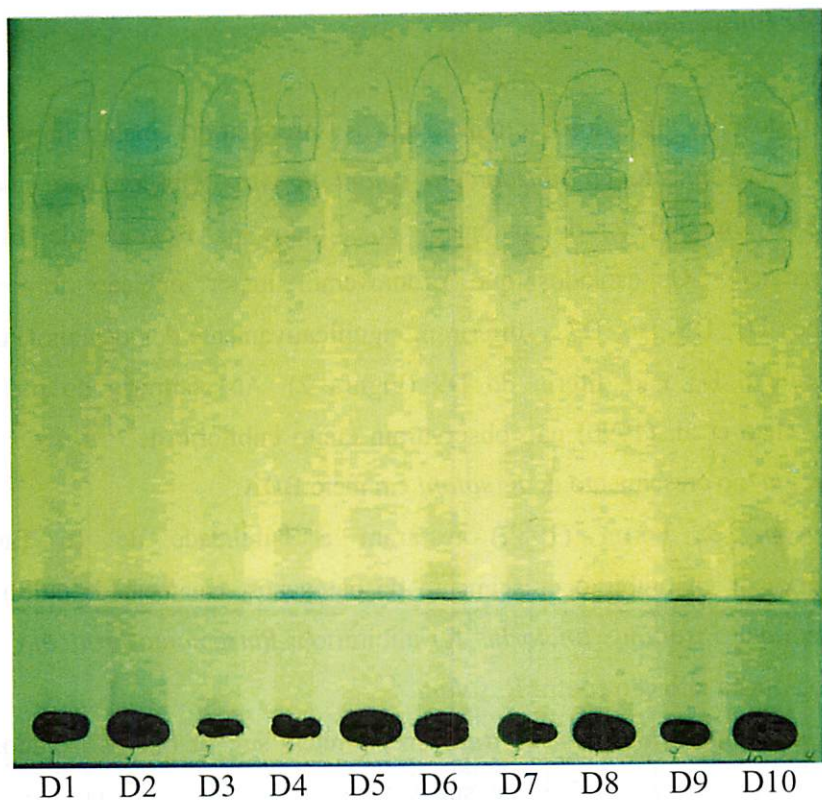


FIGURA 1. Placa de CCD com bandas formadas pelas substâncias dos isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus*, observadas sob luz UV (254 nm). D – extratos dos isolados dicarióticos

3.3 Pareamento de dez isolados dicarióticos de *Pisolithus microcarpus* com cultura de *Rhizoctonia solani*

Todos os isolados ectomicorrízicos produziram metabólitos, que inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani in vitro*. Observou-se halo de inibição do crescimento do patógeno com todos os isolados de fungos ectomicorrízicos. Os isolados que promoveram maior inibição foram os dicarióticos D1, D5, D6, D7, e diferiram significativamente dos demais (Figura 2). Somente o D5 não diferiu do D9 (Figura 2). Ao contrário do presente trabalho, Zhao et al. (1990) não observaram efeito inibitório de *P. tinctorius* e *A. panterina* no crescimento de *R. solani* em meio BDA.

Kope & Fortin (1989) testaram a habilidade de 16 fungos ectomicorrízicos em inibir o crescimento de patógenos, em meio de cultura, e observaram que *Pisolithus tinctorius* foi inibitório a *Rhizoctonia praticola*, mas apresentou pouca inibição contra *R. solani*.

Os resultados do presente trabalho permitem sugerir que os isolados de *Pisolithus microcarpus* produziram substâncias antifúngicas e é possível que possam proteger as plantas contra patógenos radiculares. Levison (1954) observou que mudas de *Pinus* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* foram resistentes a *R. solani*.

Novos estudos devem ser feitos, no sentido de identificar essas substâncias produzidas por esses fungos ectomicorrízicos e fazer testes em plantas, a fim de verificar o efeito dos exsudatos radiculares sobre a produção de metabólitos fungitóxicos e também estudar o efeito desses isolados em plantas inoculadas com fungos patogênicos.

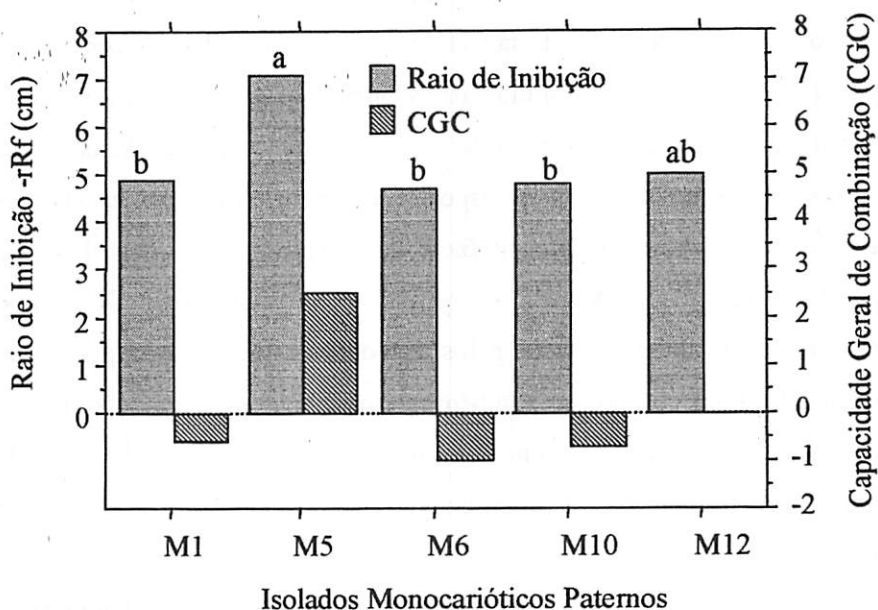
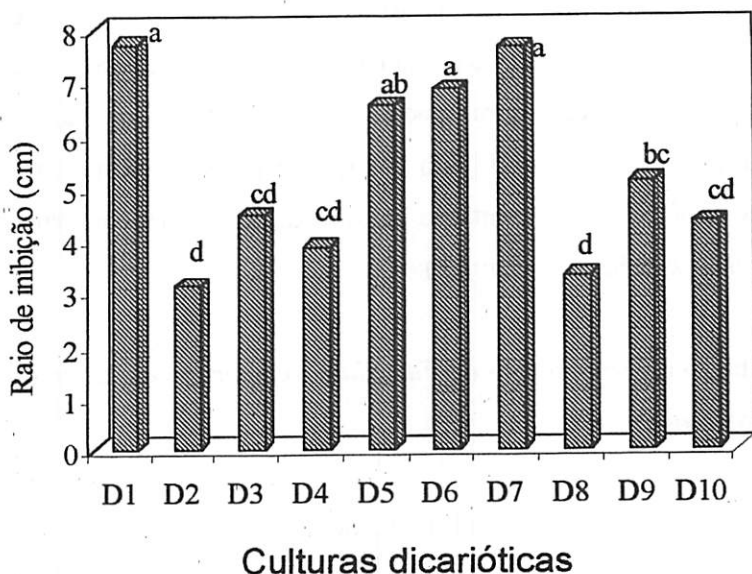


FIGURA 2. Raio de inibição (cm) de *Rhizoctonia solani*, pareada com os dez isolados dicarióticos, análise considerando também os cinco isolados monocarióticos e CGC. Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Pela análise dialélica, observa-se que o isolado monocariótico 5 (M5) apresentou CGC superior aos demais, sugerindo que esse isolado, quando cruzado com qualquer outro, poderá gerar benefícios quanto à inibição do crescimento de *R. solani* (Figura 2). Observa-se que os maiores valores dos halos de inibição são apresentados pelos dicarióticos que têm como progenitor o isolado monocariótico 5 (Figura 2).

3.4 Inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* em extratos de fungos ectomicorrízicos

Os extratos dos isolados dicarióticos não inibiram o crescimento de *Fusarium oxysporum*. Esses extratos já tinham passado por várias diluições com metanol. Acredita-se que esse fato pode ter contribuído para o efeito não inibitório da substância. Duchesne et al. (1988), trabalhando com o mesmo fungo patogênico, mas usando metodologia diferente, observaram que compostos antifúngicos sintetizados pelo fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* inibiram em 80% a esporulação de *F. oxysporum*. Os autores sugeriram que o aumento da resistência de *Pinus resinosa*, inoculado com o fungo *P. involutus*, pode ser o resultado da biossíntese de compostos antifúngicos, que são estimulados pelos exsudados radiculares da planta. Sylvia & Sinclair (1983b) observaram também que metabólitos sintetizados pelo fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* inibiram e causaram distorção de hifas e afetaram a germinação de microconídios e clamidósporos de *Fusarium oxysporum*.

Outros estudos devem ser feitos com novos extratos, a fim de se testar o efeito inibitório destas substâncias contra fungos patogênicos, uma vez que esses compostos apresentam ação antifúngica, como sugerido por Marx (1969a e

1969b; Marx & Davey, 1969); Duchesne et al. (1988) e Kope & Fortin (1989, 1990), Kope et al. (1991) e Farquar & Peterson (1991).

3.5 Detecção de substâncias antifúngicas em extratos de 3 isolados ectomicorrízicos, usando como padrão o ácido oxálico e ácido clorogênico

Todos os isolados produziram compostos, que foram visualizados sob luz UV (365 nm e 254 nm). Observou-se que os três isolados provavelmente produzem as mesmas substâncias, por possuírem o mesmo valor do fator de referência (tabela 2).

Todas as substâncias detectadas foram tóxicas ao fungo *Cladosporium herbarum* (Figura 3). Sugere-se que o fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* produz compostos antifúngicos em extratos aquosos e esses metabólitos podem ser tóxicos a patógenos radiculares, como observado no experimento anterior (item 3.3.). Também podem ser produzidos em resposta à associação com a planta hospedeira (Marx, 1969a e 1969b; Sylvia & Sinclair, 1983a e 1983b; Duchesne et al., 1989). Buscot (1992) sugeriu que a causa da resistência da planta a fungos patogênicos não é somente resultado da produção de compostos fenólicos, mas pelo aumento do vigor devido à micorrização.

É provável que os ácidos clorogênico e oxálico não estejam presentes nessas substâncias, uma vez que esses não formaram bandas coincidentes com as substâncias sintetizadas pelo fungo *P. microcarpus* (tabela 2 e Figura 3). A síntese de ácido oxálico tem sido demonstrada em diversos fungos (Hodgkinson, 1977, citado por Duchesne et al., 1989). Duchesne et al. (1989) sugeriram que a inoculação de mudas de *Pinus resinosa* com o fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* resultou num aumento da concentração de ácido oxálico na rizosfera dessas mudas, quando comparado com a testemunha.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados utilizando plantas hospedeiras, uma vez que exsudatos radiculares estimulam a síntese de compostos antifúngicos sintetizados por fungos ectomicorrízicos.

TABELA. 2. Fator de retenção (Rf)* apresentado pelas substâncias presentes em extratos de 3 isolados de *Pisolithus microcarpus*.

Extratos	Rf			
D4	0,76	0,75	0,72	0,71
D6	0,77	0,76	0,74	0,72
D7	0,75	0,72	0,70	-

*Rf = distância percorrida pela substância / distância percorrida pelo solvente



D4 D6 D7 D4 Ác. C. D6 Ác. O. D7

FIGURA 3. Extratos de 3 isolados dicarióticos de *P. microcarpus* aplicados em placa de CCD
A – halo de inibição do crescimento do fungo *Cladosporium herbarum*
D – extratos dos isolados dicarióticos
Ac. C.- ácido clorogênico
Ac. O. – ácido oxálico

4 CONCLUSÕES

- 1 - Os metabólitos presentes em extratos de micélio fresco foram detectados em todos os isolados de *Pisolithus microcarpus* e esses inibiram o crescimento de *C. herbarum* e não tiveram efeito inibitório a *Pythium sp*, *R. solani* e *Fusarium oxysporum*.
- 2 - Culturas de *Pisolithus microcarpus*, quando confrontadas com *R. solani*, produziram metabólitos, que inibiram o crescimento do patógeno.
- 3 - Extratos aquosos dos isolados D4, D6 e D7 de *P. microcarpus* foram tóxicos em relação a *C. herbarum*.
- 4 - Pela análise dos valores de Rf, as substâncias antifúngicas presentes nos extratos aquosos não correspondem ao ácido clorogênico e ácido oxálico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUSCOT, F. G. Interactions between *Cylindrocarpon destructans* and ectomycorrhizas of *Picea abies* with *laccaria laccata* and *Paxillus involutus*. *Trees*, Santa Monica, v. 6, n. 1, p. 83-90, 1992.
- BAPTISTA, M. J.; GLORIA, B. A.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 22, p. 309-315, out. 1999. Suplemento, 2.
- CHAKRAVARTY, P.; KHASA, D.; DANCİK, B.; SINGLER, WICHLACZ, M.; TRIFONOV, L. S.; AYER, W. A. Integrated control of *Fusarium* damping-off in conifer seedlings. *Journal of Plant Disease and Protection*, Stuttgart, v. 106, n. 4, p. 342 - 352, 1999.
- DUCHESNE, L. C.; BRIAN, E. E.; PETERSON, R. L. Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 67, n. 9, p. 2726-2730, Sept. 1989.
- DUCHESNE, L. C. ; PETERSON, R. L.; BRIAN, E. E. Pine root exudate Stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 471-476, Apr. 1988.
- FARQUHAR, M. L.; PETERSON, R. L. Later events in suppression of *Fusarium* root rot of red pine seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 69, n. 6, p. 1372-1383, June 1991.
- KOPE, H. H.; FORTIN, J. Inhibition of phytopathogenic fungi in vitro by Cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, Cambridge, v. 113, n. 1, p. 57-63, Sept. 1989.
- KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. Antifungal activity in culture filtrates of the Ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 68, n. 6, p. 1254-1259, June 1990.

KOPE, H. H.; TSANTRIZOS, Y. S.; FORTIN, J. A.; OGILVIE, K. K. P- hydroxybenzoylformic acid and (R) – levo p- hidroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomy corrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. **Canadian Journal of microbiology**, v. 37, n. 4, p. 258-264, Apr. 1991.

KASUYA, M. C.; TAHARA, S.; IGARASHI, T. Growth inhibition of pathogenic root fungi by extracts of ectomycorrhizal fungi of *Picea glehnii* inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Biotropia**, Bogor, v. 9, p. 53- 61, 1996.

LEVISOHN, I. Aberrant root infections of pine and spruce seedlings. **The New Phytologist**, Cambridge, v. 53, p. 284-290, 1954.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizae fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizae fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St Paul, v. 59, n. 2, p. 153-163, Feb. 1969a.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. **Phytopathology**, St Paul, v. 59, n. 4, p. 411-417, Apr. 1969b.

MARX, D. H. Growth ectomycorrhizal and nonmycorrhizal shorthe of pine Seedlings in soil with *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, St Paul, v. 63, n. 1, p. 18-23, Jan. 1973a.

MARX, D. H. Mycouuhizae and feeder root disease. In: MARKS, G. S.; KOSLOWSKI, T. T. (Ed.). **Ectomycorrhizae: their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973b. p. 351-382.

MARX, D. H.; DAVEY, C. B. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 5, p. 549-558, May 1969.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and Their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v. 30, p. 369-389, 1992.

PERRIN, R.; GARBAYE, J. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium* – infected soils and substrates. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 71, p. 345–351.

SALERNO, M. I.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI, V. P. Effects on growth and comparison of root tissue colonization patterns of *Eucalyptus viminalis* by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **The New Phytology**, Cambridge, v. 146, p. 317 – 324, 2000.

SUH, H. W.; CRAWFORD, D. L.; KORUS, R. A.; SHETTY, K. Production of antifungal metabolites by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 29-36, July 1991

SYLVIA, D. M.; SINCLAIR, W. A. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings By the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Phytopathology**, St Paul, v. 73, n. 3, p. 390-397, Mar. 1983a.

SYLVIA, D. M.; SINCLAIR, W. A. Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and Douglas fir seedlings. **Phytopathology**, St Paul, v. 73, n. 3, p. 384-389, Mar. 1983b.

TROFAST, J.; WICKBERG, B. Mycorrhizin A and chloromycorrhizin A, two antibiotics from a mycorrhizal fungus of *Monotropa hypopitys* L. **Tetrahedron**, v.33, p.875 – 879.

TSANTRIZOS, Y. S.; KOPE, H. H.; FORTIN, J. A.; OLGIVIE, K. K. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, n. 4, p. 1113 – 1118, 1991.

ZHAO, Z. P.; KUO, S. C.; BI, K. C. Selection of ectomycorrhizal fungi with resistance to *Rhizoctonia solani*. **Agriculture, Ecosystems and Environments**, Amsterdam, v. 28, n. 1/4, p. 575-579, Feb. 1990.

ZAK, B. Role of mycorrhizae in root disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 2, p. 377-392, 1964.

ANEXOS

ANEXO A

Tabelas	Página
TABELA 1 A. Resumo da análise de variância do crescimento em altura de mudas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” inoculadas com dez isolados de <i>Pisolithus microcarpus</i>	87
TABELA 2 A. Resumo da análise de variância do crescimento em diâmetro de mudas de <i>Eucalyptus</i> “ urograndis inoculadas com dez isolados de <i>Pisolithus microcarpus</i>	87
TABELA 3 A. Resumo da análise de variância do peso seco de raízes de mudas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” inoculadas com dez isolados de <i>Pisolithus microcarpus</i>	88
TABELA 4 A. Resumo da análise de variância do peso seco da parte aérea de mudas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” inoculadas com dez isolados de <i>Pisolithus microcarpus</i>	88
TABELA 5 A. Resumo da análise de variância da percentagem de micorrizas em mudas de <i>Eucalyptus</i> “urograndis” inoculadas com dez isolados de <i>Pisolithus microcarpus</i>	89
TABELA 6A. Composição química do meio MMN utilizado no crescimento dos fungos ectomicorrízicos.....	90

TABELA 1 A. Resumo da análise de variância do crescimento em altura de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" inoculadas com dez isolados de *Pisolithus microcarpus*.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	10	1531,34	153,13**	5,87
Resíduo	33	861,14	26,09	
Total	43	2392,48		
Média			38,01	
C.V%.			13,44	

** Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

TABELA 2 A. Resumo da análise de variância do crescimento em diâmetro de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" inoculadas com dez isolados de *Pisolithus microcarpu*.

Fonte de variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	10	1,266	0,126**	2,97
Resíduo	33	1,409	0,042	
Total	43	2,675		
Média			2,732	
C.V%			7,562	

** Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F

TABELA 3 A. Resumo da análise de variância do peso seco de raízes de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" inoculadas com dez isolados de *Pisolithus microcarpus*.

Fonte de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	10	0,361	0,036 ^{ns}	1,08
Resíduo	33	1,096	0,033	
Total	43	1,458		
Média			0,725	
C. V%			25,124	
NS – Não significativa a 5% de probabilidade pelo teste de F				

TABELA 4 A. Resumo da análise de variância do peso seco da parte aérea de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" inoculadas com dez isolados de *Pisolithus microcarpus*.

Fonte de variação	G. L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	10	1,983	0,1984*	2,67
Resíduo	33	2,451	0,074	
Total	43	4,435		
Média			1,434	
C.V%			19,00	
* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F				

TABELA 5 A. Resumo da análise de variância da percentagem de micorrizas em raízes de mudas de *Eucalyptus* "urograndis" inoculadas com dez isolados de *Pisolithus microcarpus*.

Fonte de variação	G.L	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamentos	9	1226,66	136,3 ^{ns}	1,41
Resíduo	90	8699,89	96,55	
Total	99	9916,55		
Média			17,21	
C.V.%			57,09	

NS – Não significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste de F

TABELA 6 A. Composição química do meio MMN
utilizado no crescimento dos fungos ectomicorrízicos.

Nutrientes	g / l água
Solução A	
CaCl ₂ . 2 H ₂ O.....	1,32 g
Na Cl.....	0,5 g
K H ₂ PO ₄	10 g
Solução B	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5 g
Solução C	
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O.....	3 g
Solução de citrato férrico 1%*	
Citrato férrico.....	0,2 g
Ácido cítrico.....	0,2 g
Autoclavar à 120° C por 15 min.	
Solução de Tiamina*	
Tiamina.....	0,1 g / 100 mL água
Filtrar	
Para 1 litro de meio:	
Solução A.....	50 mL
Solução B.....	50 mL
Solução C.....	50 mL

Extrato de Malte.....	3 g
Glicose.....	10 g
Citrato férrico 1%.....	3 mL
Tiamina.....	1 mL
Agar.....	10 g

Ajustar pH para 5,5 antes de acrescentar o ágar.

Juntar todos os reagentes, menos o citrato e a Tiamina, e autoclavar por 20 minutos a 120° C. Adicionar a tiamina e o citrato após a esterilização do meio.

ANEXO B

TABELA 1 B. Raio de inibição (cm) do crescimento de *Rhizoctonia. Solani* (discos de micélio de 10 mm de diâmetro).

<i>Pisolithus microcarpus</i>	repetições		
	1	2	3
	----- rRf -----		
D1	8,2	8,2	6,8
D2	2,8	3,4	3,2
D3	4,8	4,4	4,2
D4	4,0	3,4	4,2
D5	6,6	6,6	6,4
D6	6,8	6,8	7,0
D7	8,4	7,8	6,8
D8	3,8	2,8	3,4
D9	5,4	5,2	4,8
D10	4,2	4,4	4,4

rRf = raio de inibição / raio do disco de micélio do fungo ectomicorrizico.

